



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 333 334**

51 Int. Cl.:
A61K 39/02 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04778282 .6**
96 Fecha de presentación : **15.07.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1651260**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.05.2006**

54 Título: **Lawsonia intracellularis de origen europeo y vacunas, agentes de diagnóstico y métodos de uso de la misma.**

30 Prioridad: **25.07.2003 US 490001 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
19.02.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
19.02.2010

73 Titular/es:
BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, Inc.
2621 North Belt Highway
St. Joseph, Missouri 64506-2002, US

72 Inventor/es: **Roof, Michael, B;**
Kroll, Jeremy, J. y
Knittel, Jeffrey, P.

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 333 334 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

Lawsonia intracellularis de origen europeo y vacuna, agentes de diagnóstico y métodos de uso de la misma.

5 **Antecedentes**

La presente invención trata de vacunas de *Lawsonia intracellularis* y describe métodos para proteger frente a, y diagnosticar, una infección por *L. intracellularis*. Los productos y procesos de la invención son posibles, en parte, como resultado de un método mejorado para cultivar provisiones a gran escala de *L. intracellularis*, incluyendo tanto
10 una nueva cepa clínica de *L. intracellularis* de origen europeo como un método para preparar un producto liofilizado que contiene la cepa clínica europea atenuada como un producto de vacuna.

L. intracellularis, el agente causal de la enteropatía proliferativa porcina (“PPE”), afecta prácticamente a todos los animales, incluyendo: conejos, hurones, hámsters, zorros, caballos y otros animales tan distintos como avestruces y emus. *L. intracellularis* es una causa particularmente grande de pérdidas en el ganado porcino de Europa, así como de
15 los Estados Unidos.

Una característica uniforme de la PPE es la aparición de bacilos curvados intracitoplasmáticos no unidos a la membrana dentro de los enterocitos de las porciones afectadas del intestino. La bacteria asociada con la PPE se ha denominado “organismos de tipo Campylobacter”. S. McOrist y col., Vet. Pathol., Vol. 26, 260-264 (1989). Posteriormente, se ha identificado la bacteria causal como un nuevo género y especie taxonómicos, comúnmente denominada *Ileal symbiont* (IS) *intracellularis*. C. Gebhart y col., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, n° 3, 533-538 (1993). Más recientemente, estas nuevas bacterias han recibido el nombre taxonómico de *Lawsonia* (*L.*) *intracellularis*. S. McOrist y col., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, n° 4, 820-825 (1995). Estos tres nombres se han usado
20 de forma intercambiable para referirse al mismo organismo, según se identificará y describirá adicionalmente en este documento.

L. intracellularis es una bacteria intracelular obligada que no puede cultivarse mediante los métodos bacteriológicos normales en un medio acelular convencional, y se ha creído que requiere de células epiteliales adheridas para su crecimiento. S. McOrist y col., Infection and Immunity, Vol. 61, n° 19, 4286-4292 (1993) y G. Lawson y col., J. of Clinical Microbiology, Vol. 31, n° 5, 1136-1142 (1993) discuten sobre el cultivo de *L. intracellularis* usando monocapas de células IEC-18 epiteliales intestinales de rata en matraces de cultivo tisular convencionales. Además, H. Stills, Infection and Immunity, Vol. 59, n° 9, 3227-3236 (1991) discuten el uso de monocapas de células Intestine 407 intestinales embrionarias humanas y monocapas de células colónicas de adenocarcinoma GPC-16 de cobaya en matraces de cultivo tisular convencionales.
35

Recientemente se ha aprobado una vacuna de *L. intracellularis* para su uso en los Estados Unidos, vacuna que está basada en las cepas clínicas de *L. intracellularis* descritas y reivindicadas en las patentes de Estados Unidos n°s 5.714.375 y 5.885.823. La vacuna descrita anteriormente es comercializada por Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc., 40 2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64506-2002, con el nombre comercial ENTERISOL® Ileitis e incluye bacterias *L. intracellularis* vivas atenuadas de origen norteamericano.

Sumario de la invención

45 Un objeto de la invención es proporcionar una vacuna mejorada de *L. intracellularis* usando una cepa clínica de origen europeo.

Otro objeto de la invención es proporcionar un método de cultivo mejorado de *L. intracellularis* a gran escala y técnicas mejoradas para la producción de vacunas de *L. intracellularis*.

50 Para conseguir estos y otros objetos, y según el propósito de la invención, según se ejemplifica y se describe ampliamente en este documento, la presente invención proporciona una nueva cepa clínica de *L. intracellularis* de Europa, un método para atenuar dicha cepa clínica y la cepa clínica atenuada del mismo. En este documento también se proporciona una vacuna que comprende la cepa clínica atenuada. En este documento también se proporciona un
55 método para producir una vacuna que comprende la cepa clínica atenuada en forma liofilizada para su reconstitución en el momento de su administración y el producto liofilizado de la misma.

En una forma de realización, la nueva cepa clínica *L. intracellularis* de Europa, la cepa clínica DK 15540, es la cepa clínica depositada en la ATCC con el n° de acceso PTA-4927. En otra forma de realización, la cepa clínica atenuada derivada de la cepa clínica DK 15540, se denomina cepa clínica B3903, con el n° de acceso de la ATCC PTA-4926.
60

Descripción detallada

65 Según se usa en este documento, el término “*L. intracellularis*” significa la bacteria intracelular curvada gram-negativa descrita detalladamente por C. Gebhart y col., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, n° 3, 533-538 (1993) y S. McOrist y col., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, n° 4, 820-825 (1995), cada uno de los cuales se incorpora al presente documento como referencia en su totalidad, e incluye, pero no se limita a, la cepa clínica denominada DK 15540 que se depositó bajo el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection, 10801

ES 2 333 334 T3

University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 9 de enero de 2003 y se le asignó el número de acceso de la ATCC PTA-4927; bacteria causal que puede obtenerse a partir de cerdos o de otros animales infectados por PPE por todo el mundo dados los conocimientos en la materia y las enseñanzas de este documento; y variantes o mutantes de cualquiera de las anteriores bacterias, obtenidas tanto espontánea como artificialmente.

5 Según se usa en este documento, la expresión “cepa clínica atenuada” significa cualquier cepa clínica de *L. intracellularis* que se prepara según las técnicas de cultivo y de pase enseñadas en este documento para conseguir la avirulencia manteniendo a la vez las propiedades inmunógenas cuando se administra a un animal hospedador, incluyendo, pero no limitándose a, la cepa clínica atenuada denominada B-3903 que se depositó bajo el Tratado de Budapest
10 con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 9 de enero de 2003 y se le asignó el número de acceso PTA-4926.

La cepa clínica atenuada de la invención puede usarse como inmunógeno en vacunas antimicrobianas para animales, incluyendo aves, peces y mamíferos tales como vacas, cerdos, caballos y primates. Dichas vacunas pueden prepararse mediante las técnicas conocidas por los expertos en la materia y dadas las enseñanzas contenidas en este documento. Dicha vacuna comprendería una cantidad inmunológicamente eficaz de la cepa clínica atenuada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. La vacuna podría ser administrada en una o más dosis. Una cantidad inmunológicamente eficaz se determina mediante los medios conocidos en la materia sin una experimentación ilícita, dadas las enseñanzas contenidas en este documento. La cantidad de bacterias avirulentas debería ser suficiente para estimular una respuesta inmune en animales susceptibles a la enfermedad siendo todavía avirulentas. Esto dependerá del animal en particular, de las bacterias y de la enfermedad implicada. La dosis recomendada a administrar al animal susceptible es preferiblemente de aproximadamente una TCID₅₀ (dosis infectiva del cultivo tisular al 50% del punto final)/dosis de 3,0 hasta aproximadamente una TCID₅₀/dosis de 6,0, y más preferiblemente de aproximadamente una TCID₅₀/dosis de 4,0 hasta aproximadamente una TCID₅₀/dosis de 5,0. En una forma de realización preferible, el título de la vacuna es de aproximadamente una TCID₅₀/dosis de 4,9, según se determina mediante el ensayo de Dosis Infecciosa Del Cultivo Tisular al 50% de dilución del punto final (TCID₅₀). Los vehículos son conocidos por los expertos en la materia, e incluyen estabilizantes y diluyentes. Dicha vacuna también puede contener un coadyuvante apropiado. Las vacunas de la invención pueden usarse en combinación con otras vacunas, por ejemplo, como diluyente de otra vacuna. Las preparaciones de la vacuna también pueden desecarse, por ejemplo, mediante liofilización, con el propósito de su almacenamiento o para su subsiguiente formulación en vacunas líquidas.
30

Consecuentemente, la descripción también comprende un método para inducir una respuesta inmune ante bacterias virulentas naturales de *L. intracellularis* en un hospedador animal con el propósito de proteger a ese hospedador de dichas bacterias. El método comprende la administración de una cantidad inmunológicamente eficaz de bacterias atenuadas de la invención al hospedador, y preferiblemente, la administración de la vacuna de la invención al hospedador.
35

Según se usa en este documento, la expresión “cultivo a gran escala” significa un nivel de cultivo de *L. intracellularis* mayor de aproximadamente 2,0 a 3,0 litros, e incluye la producción a una escala de 100 litros o más. “Cultivo” según se usa en este documento, significa el proceso de promover el crecimiento, la reproducción y/o la proliferación de *L. intracellularis*.
40

L. intracellularis puede ser cultivada mediante los métodos conocidos en la materia, preferiblemente según las patentes de Estados Unidos n^{os} 5.714.375 y 5.885.823. Por ejemplo, las células del cultivo pueden ser inoculadas en primer lugar con un inóculo que comprende bacterias de *L. intracellularis* de forma que las células se infecten con las bacterias. Pueden usarse numerosas líneas celulares en la práctica de la invención, incluyendo, pero no limitándose a, IEC-18 (ATCC 1589)-células epiteliales intestinales de rata, Hep-2 (ATCC 23)-células de carcinoma epidermoide humano, McCoys (ATCC 1696)-células del ratón (no especificadas), BGMK (Biowhittaker #71-176)-células de riñón de mono verde africano, y células epiteliales intestinales porcinas. Las células del cultivo preferibles son células Hep-2, McCoys o IEC-18.
50

Si se usan células de cultivo, antes de ser inoculadas, las células deben estar en forma de una monocapa. Para formar una monocapa, las células pueden sembrarse en matraces convencionales. Cada matraz se siembra generalmente con entre aproximadamente 1×10^5 células hasta aproximadamente 10×10^5 células por 25, 75, 150, 850 cm² de matraz o frasco rotatorio mezcladas con medio de crecimiento. El medio de crecimiento puede ser cualquier medio para el cultivo celular que incluya una fuente de nitrógeno, los factores de crecimiento necesario para las células del cultivo elegidas y una fuente de carbono, tal como glucosa o lactosa. El medio preferible es DMEM reforzado con Ham F 12 con un 1-5% de suero bovino fetal, aunque puede usarse otro medio disponible comercialmente con buenos resultados.
55

El cultivo satisfactorio de *L. intracellularis* se mejora manteniendo las células del cultivo en un estado de constante crecimiento. Por lo tanto, la monocapa de células del cultivo debería de estar en aproximadamente el 20 por ciento hasta aproximadamente el 50 por ciento de confluencia en el momento de la inoculación. Preferiblemente, las células deberían estar en aproximadamente el 30 por ciento hasta aproximadamente en 40 por ciento de confluencia en el momento de la inoculación, muy preferiblemente a aproximadamente el 30 por ciento de confluencia.
60

Alternativamente, las células, antes de ser inoculadas, pueden hacerse crecer en suspensión, según se describe a continuación. Preferiblemente, las células se hacen crecer en primer lugar hasta una confluencia del 100% en forma de una monocapa en un sistema de tipo adherente, por ejemplo, un sistema de frasco rotatorio, y después se transfieren a 3-3000 litros y se hacen crecer en suspensión. Alternativamente, las células pueden hacerse crecer en suspensión
65

ES 2 333 334 T3

hasta la densidad celular deseada, por ejemplo, de 2×10^5 células/ml, dentro del depósito de 3-3000 litros (biorreactor, fermentador, matraz de agitación, etc.) usando los parámetros adecuados para el crecimiento dentro de este sistema antes de la inoculación.

5 El inóculo puede ser un cultivo puro de *L. intracellularis* obtenido a partir de cerdos o de otros animales infectados. Preferiblemente el inóculo puede ser un cultivo puro de *L. intracellularis* obtenido del nº de acceso de la ATCC PTA-4927.

10 El inóculo puede ser un homogeneizado intestinal preparado mediante el raspado de la mucosa del íleon de un cerdo o de otro animal infectado con PPE. Cuando se prepara un homogeneizado intestinal, las secciones del íleon elegidas para el cultivo deberían mostrar lesiones graves con un engrosamiento macroscópico del intestino. Debido a la naturaleza frágil de las bacterias, las muestras deberían almacenarse preferiblemente a -70°C tan rápido como sea posible tras la necropsia. Preferiblemente se añade un antibiótico al cual sea resistente *L. intracellularis* tal como vancomicina, anfotericina B o miembros del grupo de antibióticos aminoglucósidos, incluyendo gentamicina y neomicina, por nombrar algunos, al inóculo para eliminar las bacterias contaminantes a la vez que se permite el crecimiento de *L. intracellularis*. Tanto si el inóculo es un cultivo puro como si es un homogeneizado intestinal, la inoculación de las células del cultivo puede realizarse mediante varias técnicas conocidas en la materia, dadas las enseñanzas de este documento.

20 Las bacterias y/o las células del cultivo inoculadas se incuban entonces con una concentración reducida de O_2 disuelto. Con concentraciones de oxígeno disuelto mayores del 10% el crecimiento de *L. intracellularis* es inferior al óptimo, produciéndose finalmente el cese del crecimiento con unas concentraciones de oxígeno fuera de este intervalo. Preferiblemente, las bacterias y/o las células del cultivo inoculadas se incuban con una concentración de oxígeno disuelto en el intervalo de aproximadamente el 0% hasta aproximadamente el 10%. Más preferiblemente, las bacterias y/o las células del cultivo se incuban con una concentración de oxígeno en el intervalo de aproximadamente el 0% hasta aproximadamente el 8%, siendo muy preferible una concentración de oxígeno de aproximadamente el 0% hasta aproximadamente el 3,0%.

30 La concentración apropiada de dióxido de carbono también es importante para un adecuado crecimiento de *L. intracellularis*. Con concentraciones de dióxido de carbono mayores del 0% y menores del 4%, se produce un crecimiento no óptimo, produciéndose finalmente el cese del crecimiento con unas concentraciones de dióxido de carbono fuera de este intervalo. Preferiblemente, la concentración de dióxido de carbono está en el intervalo de desde aproximadamente el 6% hasta aproximadamente el 10%, siendo muy preferible una concentración de dióxido de carbono de aproximadamente el 8,8%.

35 Además, las células se incuban preferiblemente con una concentración de hidrógeno en el intervalo de desde aproximadamente el 4% hasta aproximadamente el 10%. Muy preferiblemente, las células se incuban en aproximadamente el 0 hasta aproximadamente el 8,0% de O_2 , aproximadamente el 8,8% de CO_2 , y aproximadamente el 4% de H_2 . El nitrógeno se usa como "compensador" en la mezcla de gases, que contiene nitrógeno (96%) e hidrógeno (4%) o nitrógeno (80%), dióxido de carbono (10%) e hidrógeno (10%) para el crecimiento de este organismo. Las células se incuban preferiblemente con una concentración de nitrógeno en el intervalo de desde aproximadamente el 80% hasta el 96%. Por lo tanto, las células se incuban muy preferiblemente en aproximadamente el 0 hasta aproximadamente el 8,0% de O_2 , aproximadamente el 8,8% de CO_2 , aproximadamente el 4% de H_2 y aproximadamente el 96% de N_2 .

45 Las células inoculadas pueden incubarse en un incubador gaseoso doble o en otras cámaras de gas que contengan las concentraciones apropiadas de hidrógeno, oxígeno y dióxido de carbono y que permitan a las células estar suspendidas durante la incubación. La cámara debería comprender un medio para mantener las células inoculadas en suspensión, y un monitor de gases y una fuente de suministro para suministrar y mantener las concentraciones apropiadas de gases. La temperatura de incubación debería estar en el intervalo de desde 30°C hasta aproximadamente 45°C y más preferiblemente está en el intervalo de desde aproximadamente 36°C hasta aproximadamente 38°C . Muy preferiblemente, la temperatura es de aproximadamente 37°C . El equipo necesario para el cultivo y la atenuación es fácilmente accesible para los expertos habituales en la materia, dadas las enseñanzas de este documento. Un ejemplo de un equipo adecuado para llevar a cabo la presente invención es un incubador gaseoso doble, por ejemplo, el modelo 480 (Lab-Line, Melrose Park, IL) junto con matraces de agitación para mantener las células en suspensión. El equipo actualmente preferible comprende un fermentador, un biorreactor, una placa vibradora o un agitador rotatorio que contiene al menos aproximadamente 2 litros de medio y que es capaz de mantener las células del cultivo en suspensión mediante el rociado de un gas a la concentración apropiada, u otros medios de agitación mecánica, y una monitorización continua de los niveles de O_2 disuelto en el medio. New Brunswick, Braun y otras compañías fabrican fermentadores y biorreactores adecuados para este propósito.

60 Manteniendo las células inoculadas en un estado de suspensión durante la incubación, se obtiene un crecimiento máximo de las células, y por tanto, de *L. intracellularis*, aumentando la exposición de cada célula individual al medio de crecimiento y a la mezcla adecuada de hidrógeno, oxígeno y dióxido de carbono. Las células del cultivo pueden agitarse y mantenerse en suspensión mediante una variedad de métodos conocidos en la materia, incluyendo, por ejemplo, matraces del cultivo, frascos rotatorios, cultivos de membrana, BioBags, sistemas de biorreactor WAVE™, fermentadores y matraces de agitación. Las células pueden mantenerse en suspensión durante la incubación incubando las células en un matraz de agitación dentro de un incubador gaseoso doble o un aparato similar. El término "matraz de agitación", según se usa en este documento, significa un matraz u otro recipiente que emplea una pala, una hélice u otro medio para agitar el cultivo y mantener las células contenidas en el mismo en suspensión.

ES 2 333 334 T3

En una forma de realización preferible, las células inoculadas se incuban hasta que las células alcanzan la confluencia, y entonces las células se colocan en un matraz de agitación que contiene medio de crecimiento y se incuban en un incubador gaseoso doble mientras se hace girar el matraz. Preferiblemente, las células inoculadas se raspan o se tripsinizan y se pasan al matraz de agitación. Esto puede conseguirse mediante una variedad de métodos conocidos en la materia, tal como usar un raspador celular para desprender las células. Una vez que las células han sido introducidas en el matraz de agitación, la pala del matraz de agitación se hace girar típicamente en el intervalo de desde aproximadamente 5 hasta aproximadamente 500 rpm sobre una placa de agitación magnética con objeto de mantener las células infectadas en suspensión.

Una porción de la *L. intracellularis* cultivada se pasa entonces a un cultivo nuevo para aumentar la producción de las bacterias *L. intracellularis*. El término “pasar” o variaciones del mismo en este documento significa el proceso de transferir una porción de la *L. intracellularis* cultivada a células de cultivo nuevo con objeto de infectar las células nuevas con la bacteria. El término “nuevas”, según se usa en este documento, significa células que todavía no han sido infectadas por *L. intracellularis*. Preferiblemente dichas células tienen una media de no más de aproximadamente un día de edad.

El pase de *L. intracellularis* en cultivos en suspensión puede conseguirse retirando una porción del cultivo original y añadiéndola a un nuevo matraz que contiene células de cultivo nuevas. Si el cultivo original tiene un elevado número de bacterias/ml, por ejemplo, mayor de aproximadamente 10^4 bacterias/ml, es preferible añadir entre aproximadamente el 1 y el 10% (volumen en volumen) de cultivo desde el matraz infectado a un nuevo matraz que contiene células nuevas. Esto se realiza preferiblemente cuando el 50-100% de las células están infectadas. Si hay menos del 50% de células infectadas, el pase se realiza preferiblemente dividiendo el cultivo en 1:2 en un nuevo matraz y completando el volumen añadiendo células de cultivo tisular y medio nuevos. En cualquier caso, no son necesarias las etapas de lisis celular ni otras etapas, en contraste directo con el pase de cultivos en monocapa, como en la técnica anterior.

Después de un crecimiento suficiente de las células del cultivo y de la subsiguiente infección por *L. intracellularis*, según se determina mediante una tinción con anticuerpos por fluorescencia indirecta (IFA), mediante la $TCID_{50}$ u otro método comparable, se recolecta después al menos una porción de las bacterias *L. intracellularis* cultivadas. La recolección se realiza típicamente a una infectividad celular de aproximadamente 60% o mayor; sin embargo, el experto en la materia sabe que la recolección podría realizarse a una infectividad celular de menos del 60%. La etapa de recolección puede realizarse separando las bacterias de la suspensión mediante varias técnicas conocidas por los expertos habituales una materia, dadas las enseñanzas de este documento. Preferiblemente, las bacterias *L. intracellularis* se recolectan centrifugando el contenido de todos o de una porción de la suspensión para sedimentar las células del cultivo, resuspendiendo los sedimentos celulares resultantes y lisando las células infectadas. Típicamente, al menos una porción del contenido se centrifuga a aproximadamente $3000 \times g$ durante aproximadamente 20 minutos con objeto de sedimentar las células y las bacterias. Entonces el sedimento puede resuspenderse en, por ejemplo, una disolución de sacarosa-fosfato-glutamato (SPG) y hacerse pasar aproximadamente 20 veces a través de una aguja de calibre 25 con objeto de lisar las células. Si se desea una purificación adicional, las muestras pueden centrifugarse a aproximadamente $145 \times g$ durante aproximadamente cinco minutos para eliminar los núcleos y los desechos celulares. Entonces el sobrenadante puede centrifugarse a aproximadamente $3000 \times g$ durante aproximadamente veinte minutos, y el sedimento resultante resuspenderse en un diluyente apropiado, tal como SPG con suero bovino fetal (para preparar las bacterias recolectadas adecuadamente para su liofilización, congelación o para su uso como inoculante) o medio de crecimiento (para preparar las bacterias recolectadas más adecuadamente para su pase a células nuevas).

Según se mencionó previamente, el crecimiento eficaz de *L. intracellularis* para su producción a gran escala se mejora manteniendo las células del tejido creciendo activamente. Con las monocapas, cuando los cultivos se hacen confluyentes, la tasa de división celular disminuye considerablemente. Los intentos de hacer crecer *L. intracellularis* en cultivos tisulares monocapa han tenido un éxito limitado y el aumento de escala no ha sido posible. Sin embargo, el uso de cultivos en suspensión facilita enormemente el mantenimiento de las células en crecimiento activo y permite una expansión continua del cultivo y el aumento de escala. Usando un fermentador y entre aproximadamente el 0 y el 3% de O_2 disuelto, según se explicó anteriormente, se permite el crecimiento de hasta y más de 10^8 bacterias/ml.

Cuando se usan células IEC-18, es preferible añadir gelatina, agarosa, colágeno, acrilamida o perlas de sílice, tales como microvehículos porosos Cultisphere-G (HyClone Laboratories, Logan Utah), junto con el medio de crecimiento. Sin embargo, las células HEp-2 y otras no requieren microvehículos según los métodos usados en este documento.

Con el propósito de mantenimiento del cultivo, en cultivos de HEp-2, se elimina preferiblemente del 25% al 50% del cultivo y se sustituye por medio nuevo en intervalos semanales. Para los cultivos celulares con microvehículos o perlas, se elimina preferiblemente del 25% al 50% del cultivo y se sustituye por medio nuevo 1-2 veces por semana. Con el propósito de aumentar la escala, puede añadirse al cultivo del 25% al 50% de medio adicional, o de medio con microvehículos.

Dependiendo de la tasa a la que las células del cultivo se infectan, el pase de células nuevas se produce generalmente entre aproximadamente cada 2 hasta aproximadamente 7 días. Suponiendo que las células del cultivo se infecten al menos al 70% cada 2 a 7 días, el pase se produce preferiblemente entre aproximadamente cada 5 a 7 días.

La presente invención también proporciona vacunas y métodos para producir vacunas frente a la nueva cepa clínica de *L. intracellularis* de origen europeo. Preferiblemente, tras mantener las células infectadas en suspensión durante

ES 2 333 334 T3

un tiempo prolongado (por ejemplo, 6-8 meses), al menos una porción de las bacterias *L. intracellularis* cultivadas se recolectan y se monitorizan para comprobar la potencial atenuación. Dicha monitorización se consigue preferiblemente mediante la exposición de animales hospedadores o de modelos animales para seleccionar una cepa clínica atenuada. Dichas cepas clínicas atenuadas se usan en vacunas según los métodos enseñados en este documento.

La presente invención permite una rápida expansión del cultivo y un aumento en el rendimiento de 100-1000 veces, y reduce los costos para la producción de *L. intracellularis* de origen europeo. Como resultado, el abundante suministro de bacterias *L. intracellularis* producido se atenúa fácilmente con el propósito de la producción de vacunas. El método de hacer crecer *L. intracellularis* en suspensión aumenta en gran medida la facilidad, la velocidad y el número de bacterias disponibles para este propósito. Cuántas más células y divisiones celulares se produzcan, mayor será el nivel de mutaciones que se produzca, que son ventajosas para el desarrollo de la vacuna. Por lo tanto, el crecimiento en suspensión aumenta la expresión de importantes inmunógenos controlados por genes regulados ambientalmente, y sus productos de expresión.

Las cepas clínicas atenuadas resultantes pueden cultivarse en cultivos tisulares en monocapas, pero preferiblemente se cultivan en cultivos en suspensión. Otros medios de atenuación pueden incluir la atenuación química mediante el uso de, por ejemplo, N-metilnitrosoguanidina y otros conocidos en la materia. Tanto mediante el pase múltiple como por medios químicos, se produce una *L. intracellularis* atenuada, y se selecciona para la preparación de vacunas. En una forma de realización preferible, la cepa clínica atenuada resultante es el n° de acceso de la ATCC PTA-4926.

El antígeno de la vacuna puede recolectarse mediante centrifugación o microfiltración, según se describió anteriormente. Entonces el antígeno se estandariza a un nivel definido basado en la respuesta inmune óptima del animal hospedador, determinada mediante un ajuste de la dosis en las especies animales hospedadoras. Las bacterias pueden inactivarse mediante los métodos conocidos en la materia, por ejemplo, usando formalina al 0,3% u otros agentes inactivantes para preparar una vacuna muerta. Entonces se incorpora el antígeno en un coadyuvante adecuado, tal como hidróxido de aluminio o aceite mineral, para incrementar la respuesta inmune. Entonces se usa el antígeno para vacunar al hospedador por vía intramuscular o mediante infección subcutánea, en el caso de cerdos de aproximadamente 3-4 semanas de edad, con una dosis de refuerzo si fuera necesario.

Preferiblemente, las bacterias se pasan sucesivamente para inducir y seleccionar un cultivo vivo avirulento atenuado. El cultivo se prueba en el animal hospedador para comprobar los signos de atenuación. El cultivo se recolecta según se describió anteriormente y se liofiliza. Los cerdos, por ejemplo, se vacunan por vía oral con de 1×10^4 a 1×10^6 bacterias. Aproximadamente veintiocho días después de la vacunación, los cerdos son inoculados por vía oral con aproximadamente 1×10^7 organismos de un cultivo virulento menos pasado (menos de 30 pases *in vitro* más allá de la cepa clínica original procedente del homogenizado intestinal) de *L. intracellularis*. Las necropsias de los animales infectados se realizan 21 días después de la exposición, y se observaron los intestinos delgados para evaluar las lesiones macroscópicas así como las lesiones microscópicas. También debería realizarse una PCR, una fluorescencia indirecta con anticuerpos (IFA) o una inmunohistoquímica (IHC). Aproximadamente el ochenta por ciento de los animales de control mostrarán lesiones macroscópicas o microscópicas y una prueba positiva de presencia de *L. intracellularis* en las células mucosas del intestino usando cualquiera de los métodos de prueba PCR, IFA o IHC. Los animales vacunados tendrán superficies mucosas normales, según se determina mediante observaciones histológicas, y serán negativos mediante una prueba de PCR entre 3 y 4 semanas tras la inoculación.

Generalmente, una cepa clínica atenuada inmunogénica de *L. intracellularis* se produce después de un cultivo continuó durante aproximadamente 150 días hasta aproximadamente 250 días, tiempo durante el cual el cultivo se pasa aproximadamente 50-100 veces. Sin embargo, el experto en la materia sabe que pueden producirse otros cultivos atenuados modificando estas cifras.

El producto de vacuna de la invención puede ser liofilizado. Tras la recolección, la cepa clínica puede concentrarse mediante varios métodos conocidos en la materia, y puede mezclarse con un estabilizante, por ejemplo, un estabilizante de gelatina de sacarosa. El producto de vacuna puede someterse entonces a una congelación y desecación (liofilización). Generalmente, la etapa de congelación comprende descender bruscamente hasta aproximadamente $-45^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y mantener durante desde aproximadamente 150 minutos hasta aproximadamente 480 minutos. La etapa de secado puede comprender etapas primarias y secundarias de secado. Por ejemplo, la etapa primaria de secado puede comprender: (a) descender bruscamente hasta entre aproximadamente -30°C y aproximadamente -5°C y mantener durante entre aproximadamente 120 minutos hasta aproximadamente 1000 minutos y, opcionalmente (b) descender bruscamente hasta entre aproximadamente -5°C y aproximadamente 5°C y mantener durante entre aproximadamente 150 minutos hasta aproximadamente 2000 minutos. La etapa secundaria comprende generalmente descender bruscamente hasta aproximadamente $27^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ y mantener durante entre aproximadamente 330 minutos hasta aproximadamente 1120 minutos. El experto en la materia sabe que estos intervalos pueden ajustarse dependiendo de las condiciones, por ejemplo, del volumen de partida.

Entonces se prepara una vacuna que comprende una cantidad inmunológicamente eficaz de *L. intracellularis* atenuada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización preferible, una vacuna comprende el n° de acceso de la ATCC PTA-4926 en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El inmunógeno y el vehículo combinados pueden estar en una disolución acuosa, en emulsión o en suspensión. Una cantidad inmunológicamente eficaz es determinable mediante los medios conocidos en la materia sin una experimentación ilícita, dadas las enseñanzas contenidas en este documento. En general, la cantidad de inmunógeno estará entre 5 y 5000 microgramos, y entre una

ES 2 333 334 T3

TCID₅₀ de 10^{2,0} y 10^{9,0}, preferiblemente entre una TCID₅₀ de 10^{3,0} y 10^{6,0}, más preferiblemente entre una TCID₅₀ de 10^{4,0} y 10^{5,0}, cuando se usan bacterias purificadas.

5 La presente invención también engloba vacunas de combinación que comprenden la cepa clínica atenuada de *L. intracellu-*
laris denominada con el nº de acceso de la ATCC PTA-4926 y material antigénico procedente de al menos otro
patógeno, incluyendo, pero no limitándose a: especies del género *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella choleraesuis*,
Salmonella typhimurium), especies del género *Erysipelothrix* (por ejemplo, *Erysipelothrix rhusiopathiae*), especies
del género *Haemophilus* (por ejemplo, *Haemophilus parasuis*), especies del género *Mycoplasma* (por ejemplo, *My-*
10 *coplasma hyopneumonia*), especies del género *Leptospira*, especies del género *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium*
perfringens, *Clostridium difficile*), especies del género *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus suis*), especies del
género *Brachyspira* (por ejemplo, *Brachyspira hyodysenteriae*), especies del género *Bordetella* (por ejemplo, *Borde-*
tella bronchiseptica), especies del género *Pasteurella* (por ejemplo, *Pasteurella multocida*), circovirus (por ejemplo,
circovirus porcino de tipo 2), virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS), virus de la gripe por-
cina (SIV), coronavirus (por ejemplo, virus transmisible de gastroenteritis (TGE), coronavirus respiratorio porcino),
15 parvovirus o *Escherichia coli*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una forma de realización, la vacuna de combinación comprende la cepa clínica atenuada de *L. intracellularis*
denominada con el nº de acceso de la ATCC PTA-4926 y material antigénico de *Salmonella choleraesuis*, de especies
del género *Erysipelothrix*, de especies del género *Clostridium*, de especies del género *Brachyspira*, del virus transmisi-
20 ble de gastroenteritis (TGE), y de *Escherichia coli*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. El material antigénico
de las especies del género *Clostridium* puede incluir, pero no se limita a, *Clostridium perfringens* y *Clostridium diffi-*
cil. El material antigénico de las especies del género *Erysipelothrix* puede incluir, pero no se limita a, *Erysipelothrix*
rhusiopathiae.

25 En otra forma de realización, la vacuna de combinación comprende la cepa clínica atenuada de *L. intracellu-*
laris denominada con el nº de acceso de la ATCC PTA-4926 y material antigénico de *Salmonella choleraesuis* y de
especies del género *Erysipelothrix*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En otra forma de realización, la va-
cuna de combinación comprende la cepa clínica atenuada de *L. intracellularis* denominada con el nº de acceso de la
ATCC PTA-4926 y material antigénico de *Salmonella choleraesuis* y de *Erysipelothrix rhusiopathiae*; y un vehículo
30 farmacéuticamente aceptable.

En otra forma de realización, la vacuna de combinación comprende la cepa clínica atenuada de *L. intracellularis*
denominada con el nº de acceso de la ATCC PTA-4926 y material antigénico procedente de al menos otro patóge-
no, incluyendo, pero no limitándose a: especies del género *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium tetani*), virus de
35 la gripe equina (EIV) (por ejemplo, EIV-1, EIV-2), virus del herpes equino (EHV) (por ejemplo, EHV-1, EHV-2,
EHV-3, EHV-4, EHV-5, EHV-6, EHV-7), alfavirus (por ejemplo, virus de la encefalitis oriental, virus de la encefali-
tis occidental, virus de la encefalitis de Venezuela), o virus del Nilo occidental; y un vehículo farmacéuticamente
aceptable.

40 Las vacunas según la invención se administran generalmente a animales susceptibles, preferiblemente cerdos, en
una o más dosis. La vacuna viva o muerta puede administrarse 1 ó 2 veces en intervalos de 2 semanas. Para las vacunas
vivas atenuadas es preferible una dosis. Las vías de administración preferibles de las cepas clínicas vivas atenuadas
son intramuscular, oral o intranasal, pero las vías de inyección intramuscular y subcutánea son muy preferibles para la
vacuna muerta.

45 El diagnóstico eficaz de la PPE también se ha visto obstaculizado por el tiempo requerido para cultivar la bacteria
causal. Como resultado de la presente invención, ahora es posible el desarrollo de herramientas diagnósticas que
promuevan unos ensayos rápidos y precisos para comprobar la presencia de *L. intracellularis* en muestras biológicas
tomadas de cerdos y otros animales susceptibles a la PPE.

50 Las bacterias *L. intracellularis* de origen europeo de la actual invención, o los componentes derivados de dichas
bacterias, pueden usarse como antígeno en un ELISA u otro inmunoensayo, tal como una prueba de anticuerpos inmu-
nofluorescentes ("IFA"), para detectar anticuerpos contra *L. intracellularis* en el suero y en otros fluidos corporales de
animales sospechosos de estar infectados con la bacteria. El inmunoensayo actualmente preferible es una IFA, según
55 se describe en el ejemplo a continuación. Alternativamente, las bacterias de la actual invención pueden usarse en un
ensayo de inmunotransferencia Western.

El protocolo preferible de ELISA según la invención es como sigue:

- 60 1. Añadir 0,1 ml/pocillo de antígeno diluido en tampón de cobertura. 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 de 1 a 2 horas a 37°C.
- 65 4. Lavar 3 veces con tampón de lavado.

ES 2 333 334 T3

5. Diluir el suero en tampón de bloqueo y añadir 0,1 ml al primero de los pocillos de la placa. Realizar diluciones sucesivas 1:2 por toda la placa. Incubar durante 1 hora a 37.
6. Lavar de 3 a 5 veces con tampón de lavado.
7. Diluir el conjugado en tampón de bloqueo y añadir 0,1 ml a los pocillos de la placa, e incubar durante 1 hora a 37°C.
8. Lavar de 3 a 5 veces con tampón de lavado.
9. Añadir sustrato.
10. Medir la absorbancia de la luz con un espectrofotómetro.
11. Los pocillos a los que no se ha añadido antígeno se usan como blancos.
12. Además deberían usarse controles positivos y negativos de suero porcino en cada prueba.

El protocolo preferible de inmunotransferencia Western es como sigue:

1. Analizar el antígeno en SDS-PAGE al 12% y transferirlo a una membrana de nitrocelulosa.
2. Colocar la membrana en tampón de bloqueo durante 2 horas.
3. Eliminar el tampón de bloqueo y aclarar con PBS durante 1 minuto.
4. Diluir el suero en tampón de bloqueo y añadirlo a la membrana. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
5. Lavar 3 veces con tampón de lavado (5 minutos para cada lavado).
6. Diluir el conjugado en tampón de bloqueo y añadirlo a la membrana. Incubar durante 1 hora a temperatura ambiente.
7. Lavar 3 veces con tampón de lavado.
8. Añadir sustrato durante 10 minutos o hasta que aparezca una banda intensa.
9. Aclarar con PBS.
10. Secar al aire y almacenar en la oscuridad.

Las bacterias *L. intracellularis* de origen europeo de la actual invención, o los componentes derivados de dichas bacterias, también pueden usarse para preparar antisuero o anticuerpos para uso diagnóstico, profiláctico o terapéutico. Las bacterias *L. intracellularis* de origen europeo de la actual invención, o los componentes derivados de dichas bacterias, pueden administrarse a un animal no humano en una cantidad eficaz para desencadenar una respuesta inmune, y el antisuero o el plasma que contienen los anticuerpos contra las bacterias *L. intracellularis*, o los componentes derivados de dichas bacterias, pueden recogerse según los métodos conocidos en la materia y descritos en este documento.

La presente invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que se proporcionan únicamente con un propósito ilustrativo y no deben ser interpretados como limitantes. De hecho, otras variantes de la invención serán fácilmente apreciables por el experto habitual en la materia.

Ejemplo 1

Producción de una vacuna de L. intracellularis

Aislamiento y atenuación de L. intracellularis de intestinos de cerdos europeos con Enteropatía Proliferativa Porcina (PPE)

La cepa clínica virulenta de *L. intracellularis* DK 15540 (DK 15540, DK-15540 y 15540 se usan de forma intercambiable en este documento) fue aislada por la University of Minnesota a partir de un homogeneizado ileal de un cerdo danés infectado con enteropatía hemorrágica porcina aguda. Esta cepa clínica se ha depositado bajo el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209

ES 2 333 334 T3

el 9 de enero de 2003 y se le asignó el número de acceso PTA-4927. El proceso de aislamiento incluyó el raspado de la mucosa del fleón, una homogeneización, una tripsinización durante 30 minutos, y el pase a través de una trituradora de tejidos. El homogeneizado ileal se pasó entonces a través de una serie de filtros consistentes en 5,0, 1,0 y 0,65 μm . El homogeneizado se diluyó en tampón de sacarosa fosfato glutamato con suero bovino fetal al 10% (FBS). Se realizaron alícuotas (6 x 1 ml) del homogeneizado y se almacenaron a menos de -70°C . El homogeneizado se usó como inóculo para infectar matraces en T de 75 cm^2 de células McCoy. Los cultivos se monitorizaron diariamente para controlar la infección de las células McCoy raspando las monocapas de células McCoy, lisando las células mediante un tratamiento con cloruro potásico y colocando el sedimento de células concentradas en portaobjetos para microscopio teñidos mediante IFA, usando anticuerpos monoclonales específicos para *L. intracellularis*. Después de once pases en cultivos celulares dependientes de anclaje, el inóculo del pase once se transfirió a un matraz de agitación de 250 ml que contenía células McCoy y se hizo crecer en suspensión hasta su recolección. La cepa clínica danesa de *L. intracellularis* (n° de acceso de la ATCC PTA-4927) se atenuó mediante el pase continuo *in vitro* en células McCoy durante 80 semanas, y se comprobó su identidad mediante anticuerpos monoclonales. La cepa clínica atenuada se denominó B3903 (B3903, B 3903 y B-3903 se usan de forma intercambiable en este documento). La cepa clínica B3903 se depositó bajo el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 el 9 de enero de 2003 y se le asignó el número de acceso de la ATCC PTA-4926.

Cultivos

Identificación

Se usaron los requerimientos de crecimiento característicos, las reacciones de PCR y las reacciones con anticuerpos monoclonales para identificar los materiales de las Siembras Maestras y de Trabajo de *L. intracellularis*.

Pureza

La pureza de la Siembra Maestra y de la Siembra de Trabajo de *L. intracellularis* se determinó examinando los cultivos mediante tinciones con anticuerpos monoclonales, pruebas convencionales de agentes extraños para bacterias y virus y mediante pruebas de esterilidad de micoplasma.

Virulencia

Las Siembras Maestras de *L. intracellularis* no eran virulentas, según se demostró por la ausencia de la capacidad de la Siembra Maestra y del inóculo del retopase de producir los signos clínicos y las lesiones macroscópicas que se observan en cerdos susceptibles tras la exposición a *L. intracellularis* virulenta, según se ilustra adicionalmente en el Ejemplo 2, a continuación.

Intervalo de subcultivos

El material final recolectado de la producción de *L. intracellularis* no superó los once pases a partir de la Siembra Maestra.

Composición del medio

Se hicieron crecer Reservas Maestras de Células McCoy europeas (MCS) y se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco con Ham F12 reforzado (DMEM/F12) y un 1-10% (v/v) de suero bovino neonatal (NBS) o de suero bovino fetal (FBS) (medio de crecimiento y mantenimiento celular).

Las Siembras Maestras y de Trabajo se almacenaron en DMEM/F12 con un 1-10% (v/v) de NBS o de FBS y un 5-15% (v/v) de glicerol (medio de almacenamiento de las siembras maestras y de trabajo).

El producto final recolectado se almacenó en estabilizante de gelatina de sacarosa (SGS) (medio de almacenamiento del producto final).

Propagación

Los cultivos de las Siembras Maestras y de Trabajo de *L. intracellularis* se propagaron en MCS McCoy europeas usando medio de crecimiento y de mantenimiento celular según se describió anteriormente, y se almacenaron a menos de o a aproximadamente -35°C .

Origen de los tejidos

Las siembras de *L. intracellularis* y los organismos de producción se hicieron crecer en Reservas Maestras de Células McCoy (n° de acceso de la ATCC CRL 1696, número de lote F-10422). La reserva de mastocitos se identificó como 3894MMCSS en el pase X. La reserva maestra de células se pasó seis veces adicionales y se identificó como MCS McCoy europeas X+0. El pase de McCoy MCS X+0 europeas se almacenó a $-70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ o más frío. La producción de la vacuna se realizó en subcultivos de la línea celular MCS McCoy europea a través del pase 40°.

ES 2 333 334 T3

Recipientes de cultivo

Las McCoy MCS europeas se propagaron en matraces de cultivo tisular con un área superficial de 25-150 cm², en cubas de células Costar, en frascos rotatorios con entre 850 cm² y 2, 2250 cm², en matraces de agitación de hasta 40 l de capacidad, y en biorreactores con desde 3 l hasta 500 l de capacidad.

Los cultivos sembrados de *L. intracellularis* se hicieron crecer en matraces de agitación de 250-40.000 ml, en frascos rotatorios de 850 cm² a 2.250 cm², en matraces de cultivo tisular con un área superficial de 25-150 cm² o en biorreactores con desde 3 l hasta 500 l de capacidad.

Los cultivos de producción de *L. intracellularis* se hicieron crecer en matraces de agitación de 6 l hasta 40 l o en biorreactores con desde 3 l hasta 500 l de capacidad.

Métodos para preparar suspensiones para la siembra o la inoculación

Cultivos de siembra

Se descongelaron Siembras Maestras o expandidas de Trabajo congeladas o frescas de *L. intracellularis* a temperatura ambiente (25°C ± 3°C) o a 37°C ± 2°C. Los biorreactores, los matraces de agitación o los frascos previamente sembrados con células McCoy a una densidad celular de 50.000 a 500.000 células/ml se infectaron con *L. intracellularis* a una concentración del 1 al 10% (v/v) o una MOI de 0,08 a 1,0. El cultivo infectado se incubó con una concentración de oxígeno reducida cubriéndolo con una mezcla de gases formada por un 86% de N₂, un 4% de H₂ y un 10% de CO₂. El cultivo se incubó durante entre 3 y 10 días a 37°C ± 2°C, a un pH de 6,7 a 7,3, y con agitación continua (de 10 a 100 rpm) para mantener una mezcla adecuada para que las células permanezcan en suspensión.

Cultivos de producción

Se descongelaron Siembras Maestras o expandidas de Trabajo congeladas o frescas de *L. intracellularis* a temperatura ambiente (25°C ± 3°C) o a 37°C ± 2°C. Los biorreactores o los matraces de agitación de 3 l a 500 l de capacidad) previamente sembrados (de 0 a 7 días) con células McCoy a una densidad celular de 50.000 a 500.000 células/ml se infectaron con *L. intracellularis* a una concentración del 1 al 10% (v/v) o una MOI de 0,08 a 1,0. El cultivo infectado se incubó con una concentración de oxígeno reducida cubriéndolo o rociándolo con una mezcla de gases formada por un 96% de N₂, un 4% de H₂. El cultivo se incubó durante entre 3 y 8 días a 37°C ± 2°C, a un pH de 6,7 a 7,3, y con agitación continua (de 10 a 100 rpm) para mantener una mezcla adecuada para que las células permanezcan en suspensión.

Técnicas de inoculación de los cultivos de siembra y de producción

Cultivos de siembra

Se inocula hasta el 10% (v/v) de Siembra Maestra o de Trabajo (MOI = de 0,08 a 1,0) en biorreactores, matraces de agitación o frascos sembrados con células McCoy de 0-7 días en medio de crecimiento.

Cultivos de producción

Se inoculó hasta el 10% (v/v) de la Siembra de Producción (MOI = de 0,08 a 1,0) en un volumen apropiado del medio de crecimiento sembrado con células McCoy de 0 a 7 días con la densidad de células McCoy apropiada en depósitos de 3 l a 500 l de capacidad.

Incubación de los microorganismos

Los cultivos se incubaron a 37°C ± 2°C durante entre 3 y 10 días en una atmósfera de oxígeno reducida con agitación para mantener la suspensión. Puede añadirse medio y/o células McCoy adicionales para continuar el proceso de crecimiento.

Los cultivos se observaron macroscópicamente durante el periodo de incubación para buscar pruebas de un crecimiento anormal o signos de contaminación.

Recolección

Manipulación y preparación de los cultivos

Los cultivos se examinaron buscando signos de un crecimiento bacteriano adecuado mediante una tinción con anticuerpos por fluorescencia indirecta (IFA). Los cultivos que estaban preparados para ser recolectados ejemplificaron del 60 al 100% de infectividad celular. El porcentaje de infectividad se determinó mediante la observación de al menos tres campos, conteniendo cada campo suficientes células McCoy para completar al menos el 80% del área. Para que se considere como infectada, aproximadamente el 50% de la célula está llena de bacterias.

ES 2 333 334 T3

La potencia del cultivo recolectado se comprueba mediante valoración de la muestra en células McCoy que están fijadas y teñidas usando anticuerpos monoclonales específicos (anticuerpo monoclonal anti-*L. intracellularis* VPM 53 Lote 31599 o equivalente; conjugado de IgG anti-ratón-fluoresceína (FITC) (ICN n° 55499) después de 6 días de incubación a 37°C ± 2°C.

5

Los cultivos se examinaron visualmente para comprobar cualquier signo obvio de contaminación. La recolección se produjo entre los 3 y los 10 días tras la inoculación.

10 *Técnicas y especificaciones de recolección*

Las células y los contenidos fluidos del biorreactor, de los matraces de agitación y del frasco del cultivo de producción se recolectaron parcial o completamente en un depósito colector estéril. Cada biorreactor, matraz de agitación y frasco del cultivo de producción se recolectó individualmente, o se agrupó el contenido de varios depósitos con la adición de SGS y se almacenaron a entre 1°C y 7°C o más frío. Se tomaron muestras del cultivo de producción recolectados para comprobar la potencia mediante la TCID₅₀ y su identificación mediante una tinción IFA.

15

Los cultivos de producción mostraron una TCID₅₀ de al menos 4,9/ml mediante una tinción IFA y no presentaban ninguna prueba de contaminación tras su observación microscópica.

20

Preparación del producto de vacuna

Métodos de concentración

25

El producto de vacuna puede concentrarse mediante varios métodos, por ejemplo, permitiendo sedimentar el cultivo con la subsiguiente decantación del sobrenadante, mediante filtración de membrana (0,22 µm o menor), perfusión o mediante centrifugación.

30

Estabilizante de gelatina de sacarosa (SGS)

Se prepara una disolución de gelatina hidrolizada mezclando la gelatina con agua desionizada o agua para inyección a aproximadamente el 25% del volumen final total del tamaño del lote de SGS e hidrolizando en un autoclave durante 120 minutos a 121°C.

35

La disolución de gelatina hidrolizada (40,0 g/l) se mezcló entonces con agua desionizada o agua para inyección a aproximadamente el 75% del volumen final total del tamaño del lote de SGS. Se añadieron hidróxido potásico (AR) (0,548 g/l), ácido L-glutámico (1,440 g/l), fosfato dipotásico (AR) (2,508 g/l), dihidrogenofosfato potásico (AR) (1,030 g/l), y sacarosa (AR) (150,00 g/l) y la disolución se mezcló exhaustivamente. Entonces se ajustó el pH del estabilizante a entre 6,8 y 7,0 con disoluciones de ácido clorhídrico o de hidróxido sódico. Se añadió agua desionizada o agua para inyección hasta el 100% del volumen final deseado del SGS. El estabilizante completo se mezcló exhaustivamente, y toda la disolución se esterilizó mediante filtración a través de un filtro de 0,1 micrómetros.

40

En la Tabla 1 se muestra un ejemplo de Montaje de Unidades para Hacer una Serie:

45

TABLA 1

50

<i>L. intracellularis</i>	200.000-300.000 ml
Estabilizante de gelatina de sacarosa (SGS)	100.000 ml (25% v/v)
DMEM/F12 (puede añadirse para estandarizar el producto)	0-150.000 ml
VOLUMEN TOTAL	400.000 ml

55

60

65

El volumen de una serie media era de entre 50 l y 500 l.

ES 2 333 334 T3

Liofilización

El producto de vacuna se liofilizó según el procedimiento esquematizado en la Tabla 2 para un ciclo de 10 dosis (6,0 ml de llenado) o en la Tabla 3 para un ciclo de 50/100 dosis (10,0 ml de llenado).

TABLA 2

ETAPAS	°C	Tasa (minutos)	Mantener (minutos)	Presión (mT)
PRE-REFRIGERACIÓN *	5°	Na	Na	Atm
CONGELACIÓN	-47° ± 3°	Tan rápido como sea posible	150	Atm
1° SECADO, 1°	-15° ± 2°	120	120	100-150
1° SECADO, 2°	0° ± 2°	120	180	100-150
2° SECADO, 1°	32° ± 2°	240	180	60-80
2° SECADO, 2°	26° ± 2°	240	Tan rápido como sea posible	60-80

Tiempo Total: 1352 minutos (22,5 horas)

* Los estantes están pre-refrigerados a 5° ± 2°C durante la carga del liofilizante.

TABLA 3

ETAPAS	°C	Tasa (minutos)	Mantener (minutos)	Presión (mT)
PRE-REFRIGERACIÓN *	5°	N/A	N/A	Atm
CONGELACIÓN	-48° ± 3°	60	90	Atm
1° SECADO	-15° ± 2°	60	1500	100-150
2° SECADO	26° ± 2°	60	600	60-80

Tiempo Total: 2370 minutos (39,5 horas)

* Los estantes están pre-refrigerados a 5° ± 2°C durante la carga del liofilizante.

ES 2 333 334 T3

Ejemplo 2

Seguridad de la vacuna de L. intracellularis

5 *Propósito*

Los objetivos de este estudio fueron dobles. El primer objetivo de este estudio era observar y comparar la incidencia de la enfermedad causada por tres cepas clínicas diferentes de bajo pase (dos de origen estadounidense y una de origen europeo) de *L. intracellularis* en cerdos a las 6 ½ semanas de edad. El segundo objetivo era observar la seguridad de dos cepas clínicas de alto pase (ambas de origen europeo) de *L. intracellularis* en cerdos a las 6 ½ semanas de edad.

Materiales y métodos

15 *Sustancias de prueba*

1. Cepa clínica estadounidense de bajo pase N343 de *L. intracellularis*
2. Cepa clínica estadounidense de bajo pase N101494 de *L. intracellularis*.
3. Cepa clínica europea de bajo pase DK 15540 p20 de *L. intracellularis*
4. Cepa clínica europea de alto pase DK 15540 p60 de *L. intracellularis*
- 25 5. Cepa clínica europea de alto pase DK 15540 p80 (denominación de la Siembra Maestra B3903) de *L. intracellularis*

Formulación de las sustancias de prueba

30

Las cepas clínicas de bajo pase se hicieron crecer de forma continua durante 10-20 semanas tras su aislamiento en una suspensión de células McCoy. Las cepas clínicas de alto pase se hicieron crecer de forma continua durante 60-80 semanas tras su aislamiento en una suspensión de células McCoy. Todos los cultivos se recolectaron mediante centrifugación a 10.000 RPM durante 15 minutos. Los sedimentos del cultivo celular McCoy que contenían la Lawsonia se resuspendieron en una disolución de Sacarosa-Fosfato-Glutamina (SPG) con un 10% de FBS.

35

Almacenamiento de las sustancias de prueba

40 Los cultivos recolectados se almacenaron a -70°C hasta el día de la exposición. Los cultivos de exposición de la misma cepa clínica pero de diferentes fechas de recolección se descongelaron y se combinaron en frascos de plástico de vacunas, se etiquetaron y se almacenaron a 4°C o en hielo hasta el momento de la exposición.

45 *Ensayo de las sustancias de prueba*

Se realizó una TCID₅₀ en todas las cepas clínicas expuestas agrupadas en el momento de la exposición (día 0). Los títulos medios (n=3) (TCID₅₀/ml) fueron como sigue en la Tabla 4:

50

TABLA 4

55

60

65

Sustancia de prueba	Título medio (TCID ₅₀ /ml)
<i>L. intracellularis</i> N343	6,4
<i>L. intracellularis</i> N101494	6,1
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p20	6,2
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p60	6,87
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p80	7,4

ES 2 333 334 T3

Diseño del estudio

El estudio consistió en cinco grupos experimentales y un grupo de control. En el día 0 del estudio, el Grupo 1 (10 cerdos, 6 ½ semanas de edad) recibió una dosis intragástrica (IG) de 10 ml o equivalente de la cepa clínica estadounidense de bajo pase N343 de *L. intracellularis*. El grupo 2 (10 cerdos, 6 ½ semanas de edad) recibió una dosis IG de 10 ml o equivalente de la cepa clínica estadounidense de bajo pase N101494 de *L. intracellularis*. El grupo 3 (10 cerdos, 6 ½ semanas de edad) recibió una dosis IG de 10 ml o equivalente de la cepa clínica europea de bajo pase DK15540 p20 de *L. intracellularis*. El grupo 4 (10 cerdos, 6 ½ semanas de edad) recibió una dosis IG de 10 ml o equivalente de la cepa clínica europea de alto pase DK15540 60 semanas de *L. intracellularis*. El grupo 5 (20 cerdos, 6 semanas de edad) recibió una dosis de 10 ml o equivalente de la cepa clínica europea de alto pase DK 15540 p80 de *L. intracellularis*. El grupo 6 (10 cerdos, 6 ½ semanas de edad) denominado "Controles Estrictos" no recibió tratamiento.

Se realizaron observaciones diarias de la salud desde el inicio del estudio hasta el día de la exposición de los animales de prueba apropiados. La salud clínica (comportamiento, apetito, estado corporal, capa pilosa y consistencia de las deposiciones) se puntuaron diariamente en una escala de 1 a 4 desde el día de la exposición (día 0) hasta la finalización del estudio (día 21). Las ganancias de peso medias diarias (ADWG) se calcularon desde el día de la exposición (día 0) hasta la finalización del estudio (día 21). Se evaluó la presencia en heces de *L. intracellularis* en los días 0, 7, 14 y 21. El único animal que murió (del Grupo 1) a lo largo del estudio se examinó para comprobar las lesiones macroscópicas y microscópicas. Se determinó que la muerte era debida a lesiones asociadas con la PPE confirmadas mediante histología y un análisis por PCR; el animal no se reemplazó. El análisis cualitativo del contenido de Lawsonia en heces se evaluó mediante PCR junto con una evaluación histológica de *L. intracellularis* en el íleon y el colon. Se recogió suero en los días 0, 7, 14 y 21 del estudio.

Resultados

Resumen de los resultados del estudio

TABLA 5

Grupo	Tratamiento	Nº de cerdos	Título (TCID ₅₀ /ml)	Serología	Presencia en heces	PC R	FA	Histología	Lesiones macroscópicas	ADWG	Puntuaciones clínicas
1	N343	9	7,4	19%	11%	0%	11%	44%	1	0,61	5,23
2	N101494	10	7,1	10%	10%	10%	30%	30%	1,2	0,8	5,15
3	DK15540p20	10	7,2	18%	13%	30%	10%	20%	1,2	0,86	5,01
4	DK15540p60	10	7,87	5%	0%	0%	0%	10%	1	0,9	5
5	DK15540p80	20	8,4	0%	0%	0%	0%	0%	1	1,05	5
6	Controles estrictos	10	0	0%	0%	0%	0%	0%	1,05	0,91	5

Observaciones generales

Se realizaron observaciones diarias de la salud hasta la exposición. Se evaluó el estado clínico de los animales diariamente tras la exposición durante la duración del estudio. Las observaciones incluyeron: comportamiento, apetito, estado corporal, capa pilosa y consistencia de las deposiciones. El estado clínico de estos animales se evaluó en base a un sistema de puntuación numérico, que refleja la gravedad de la enfermedad. Las puntuaciones variaban desde 1 hasta 4 para cada parámetro. Se dio una puntuación de 1 a un animal con un aspecto normal y saludable, una puntuación de 3 a un animal que mostraba signos clínicos graves y una puntuación de 4 a un animal que había fallecido. La puntuación diaria media de los controles estrictos, DK15540 p60 y DK15540 p80 era de 5,0. Las puntuaciones diarias medias del material de bajo pase fueron N343 (5,23), N101494 (5,15) y DK15540 p20 (5,01). El análisis estadístico de estos resultados no indicó diferencias entre los grupos de tratamiento y de control usando la prueba de la suma por rangos de Kruskal-Wallis.

ES 2 333 334 T3

Ganancias de peso medias diarias (ADWG)

Las ganancias de peso medias diarias se calcularon a partir del momento de la exposición (día 0) hasta la finalización del estudio (día 21). La ganancia de peso media por día del grupo de control estricto fue de 0,408 kg. La ganancia de peso media de los grupos de tratamiento de bajo pase fue de sólo 0,272 (N343), 0,363 (N101494) y 0,39 (DK15540 p20) kg/día. Los grupos de tratamiento de alto pase revelaron la misma ganancia de peso por día, o aumentada, en comparación con el grupo de control estricto que no fue expuesto, con 0,408 kg/día (DK15540 p60) y 0,476 kg/día (DK15540 p80) respectivamente. La diferencia media en las ganancias de peso medias diarias fue significativamente menor en el grupo de tratamiento N343 en comparación con los grupos de tratamiento de alto pase (DK15540 p60 y p80) y los grupos de control estricto en el día 21 del estudio. (Prueba de la χ^2 de Pearson $p < 0,05$).

Seroconversión

Se midió la seroconversión tras la exposición a *Lawsonia* en cerdos comprobando la presencia de anticuerpos anti-*Lawsonia* usando un ensayo IFAT. En el día 0, sólo en el grupo de tratamiento N343 se observó una seroconversión detectable en 2/10 cerdos. En el día 7 se observó en 2/9 cerdos (N343) y en 1/10 cerdos (DK15540 p20) un IFA positivo para los anticuerpos de *Lawsonia*. En el día 14, 2/9 cerdos eran positivos en el IFA en el grupo de tratamiento N343, 1/10 en DK15540 p20 y p60 respectivamente. El día 21 reveló 1/10 cerdos (N343), 4/10 cerdos (N101494) y 6/10 cerdos (DK15540 p20) que eran positivos en el IFA, mientras que los grupos de tratamiento de alto pase (DK15540 p60 y p80) no mostraban una seroconversión detectable. La seroconversión tras la exposición a *Lawsonia* aumentó en los grupos de tratamiento que recibían *L. intracellularis* de bajo pase tanto de las cepas clínicas estadounidenses como europeas en el día 21 del estudio.

Presencia en heces

Las pruebas de PCR en las heces demostraron la presencia de *L. intracellularis* comenzando el día 14, en el que 4/9 en el N343, 4/10 en el N101494 y 5/10 en el DK15540 p20 de animales de bajo pase dieron positivo. Tanto los grupos de tratamiento de alto pase como de control estricto eran negativos en la PCR el día 14. En el día 21, el grupo de tratamiento DK15540 p20 tuvo 1 animal positivo en la PCR, mientras que el resto de los grupos de tratamiento de control dieron negativo en la PCR. No se observó ninguna prueba de la presencia en los grupos de cepas clínicas de alto pase (DK15540 p60 y p80) usando una PCR a lo largo del estudio. Los animales positivos en la PCR, que indicaba una presencia activa de *Lawsonia* en sus heces, eran más significativos en los grupos de cepas clínicas de bajo pase (N343, N101494 y DK15540 p20) en el día 14 del estudio que los grupos de cepas clínicas de alto pase los controles estrictos (Prueba de la χ^2 de Pearson $p < 0,05$).

PCR en el día 21: íleon y colon

La prueba de PCR de los raspados de mucosa del íleon y el colon se realizó tras la necropsia (día 21). Las muestras que fueron positivas en la PCR para la colonización por *L. intracellularis* eran (2/10 colon) en los grupos de cepas clínicas de bajo pase N101494 y (2/10 íleon y 4/10 colon) en DK 15540 p20. Todos los demás grupos de tratamiento y de control fueron negativos en la PCR de los tejidos el día 21 del estudio. Los resultados indicaron que el íleon y el colon de los cerdos de DK15540 p20 estaban significativamente más colonizados por *L. intracellularis* en comparación con todos los grupos de tratamiento de control (* Prueba de la χ^2 de Pearson $p < 0,05$).

Histología

Se recogieron secciones del íleon terminal y del colon en la necropsia (día 21) y se colocaron en formalina taponada para su análisis histológico. Se observó la presencia de bacterias intracelulares y una hiperplasia de las criptas en los tejidos teñidos con hematoxilina y eosina (H&E) y reactivos de plata de Warthin-Starry de 4/9 cerdos (N343), 3/10 cerdos (N101494), 2/10 cerdos (DK15540 p60) y 1/20 cerdos (DK15540 p80). El desarrollo de lesiones fue confirmado mediante una tinción con anticuerpos fluorescentes usando anticuerpos monoclonales contra *Lawsonia intracellularis* en 1/9 cerdos (N343), 3/10 cerdos (N101494) y 1/10 cerdos (DK15540 p60). La FA no detectó lesiones causadas por *Lawsonia* en el colon de ninguno de los grupos de tratamiento ni de control. Los resultados de la FA indicaron el desarrollo de una lesión significativa en el íleon de cerdos del grupo de tratamiento N101494 en comparación con todos los grupos de tratamiento y de control. La tinción H&E / plata mostró el desarrollo de una lesión significativa asociada a la PPE en el grupo de tratamiento N343 en comparación con todos los grupos de tratamiento y de control. (Prueba de la χ^2 de Pearson $p < 0,05$).

Puntuaciones macroscópicas

Se puntuaron el íleon y el colon en el momento de la necropsia (día 21) para evaluar las lesiones asociadas con la PPE. A los tejidos se les dio una puntuación de 1 para un aspecto normal (sin desarrollo de lesiones), una puntuación de 2 para las lesiones que mostraban un engrosamiento leve, de 3 para un engrosamiento moderado y una puntuación de 4 para un engrosamiento grave. Los controles estrictos tenían una puntuación clínica media de 1,05, N343 (1,0), N101494 (1,2), DK15540 p20 (1,2) y DK15540 p60 y p80 (1,0). La puntuación de las lesiones macroscópicas medias no indicó una diferencia estadística entre los grupos de control y de tratamiento usando la prueba del análisis de la variancia para comparaciones múltiples.

ES 2 333 334 T3

Conclusiones

Basándonos en los datos recogidos, este estudio demuestra que los cerdos expuestos a una dosis de pase baja de N343, N101494 y DK15540 con una TCID₅₀ mayor de 1×10^7 bacterias/dosis aumenta la incidencia de la PPE en estos animales. Las cepas clínicas de alto pase (DK15540 p60 y p80) dadas a los cerdos de la misma edad con una TCID₅₀ mayor de 1×10^7 demostraron ser seguras y mostraron una reducción de la colonización y del desarrollo de lesiones asociadas con la PPE. Esta conclusión se basó en la PCR de la mucosa del íleon, la histopatología y las tinciones FA de las secciones tisulares.

Se hizo evidente una reducción de la presencia de *L. intracellularis* en las heces determinada mediante PCR en las cepas clínicas de alto pase en comparación con las cepas clínicas de bajo pase. Las ganancias de peso medias diarias calculadas para todos los grupos de tratamiento de control apoyan esta conclusión, mostrando una ganancia de peso diaria uniforme positiva en los grupos que recibieron la cepas clínicas de alto pase y en los controles estrictos en comparación con los grupos que recibieron cepas clínicas de bajo pase, especialmente los animales del grupo de tratamiento N343. Esta observación indica una reducción en las ganancias de peso en los animales que recibieron material de bajo pase, que apoya un rendimiento de crecimiento adecuado y similar de los animales que recibieron material de alto pase con los animales que no recibieron ningún material de exposición. En comparación con los controles estrictos, las cepas clínicas de alto pase no mostraron un impacto negativo en la ganancia de peso ni en la salud global basándonos en las puntuaciones clínicas.

Ejemplo 3

Eficacia y título protector mínimo

Propósito

Los objetivos de este estudio eran determinar el título protector mínimo de una vacuna que comprende la cepa clínica B3903 (liofilizada) (DK 15540, pase 80) (“vacuna B3903 (liofilizada)” y “vacuna B3903” se usan de forma intercambiable en este documento) administrada mediante enjuagues orales a cerdos de 3 semanas de edad y para demostrar su eficacia frente a una exposición virulenta de un cultivo puro heterólogo de bajo pase de *L. intracellularis*, el agente causal de la Enteropatía Proliferativa Porcina (PPE) en cerdos.

Materiales y métodos

Sustancia de prueba: cultivo vivo atenuado de *L. intracellularis*, cepa clínica B3903

Formulación de la vacuna de B3903 (liofilizada)

Las cepas clínicas DK 15540 se hicieron crecer de forma continua durante 80 semanas tras su aislamiento en una suspensión de células McCoy. Todos los cultivos se recolectaron mediante centrifugación a 10.000 RPM durante 15 minutos. Los sedimentos del cultivo de células McCoy que contenían la Lawsonia se resuspendieron en una disolución de Sacarosa-Fosfato-Glutamina (SPG) con un 10% de FBS. La desecación se realizó según se describe en el Ejemplo 1, anteriormente. El producto liofilizado es reconstituido en agua, c.s.p. 2,0 ml, para inyección.

Almacenamiento de la vacuna de B3903 (liofilizada)

La vacuna se almacenó a 2°C-8°C hasta que estuviera lista para su uso. Después de la resuspensión, la vacuna se almacenó en hielo hasta su administración.

Dosis de la vacuna de B3903 (liofilizada)

1. Dosis alta (grupo de tratamiento 1): 1 x 2 ml (6,0 logs/dosis) mediante un enjuague oral directo en el día 0 del estudio.
2. Dosis media (grupo de tratamiento 2): 1 x 2 ml (4,9 logs/dosis) mediante un enjuague oral directo en el día 0 del estudio.
3. Dosis baja (grupo de tratamiento 3): 1 x 2 ml (3,8 logs/dosis) mediante un enjuague oral directo en el día 0 del estudio.

ES 2 333 334 T3

Sustancia de prueba: placebo

Se administró un placebo consistente en células del cultivo tisular McCoy no infectadas suspendidas en medio de crecimiento DMEM/F12 reforzado con NBS al 5% a los grupos de tratamiento 4 (control de exposición) y 5 (control negativo) en el día 0 del estudio. Esta sustancia se administró a los lechones del grupo de tratamiento 4 mediante un enjuague oral directo, y se administraron 1 x 2 ml de placebo por animal de prueba.

Sustancia de prueba: exposición virulenta de L. intracellularis N101494

Se obtuvo *L. intracellularis* N101494 del intestino de un cerdo de 12 semanas de edad de una granja de Indiana (patente de Estados Unidos 5.714.375).

Formulación de la exposición virulenta de L. intracellularis N101494

El material de exposición de *L. intracellularis* se hizo crecer de forma continua en una suspensión de células McCoy no más de 30 pases tras el aislamiento inicial a partir del tejido intestinal infectado. Los cultivos activos (2 x 3 l) identificados como SF 1422 y SF 1423, además de (1 l) SF 1421, se hicieron crecer en una suspensión de células McCoy durante 7 días hasta una infección de las células McCoy del 15-30%. El día de la exposición (día 21), los cultivos activos se recolectaron mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 15 minutos, y los sedimentos celulares se resuspendieron en 350 ml de volumen total con estabilizante SPG. El cultivo activo recolectado se agrupó con 300 ml de reservas de exposición N101494 concentradas de 10X a 20X congeladas de bajo pase a varios pases (pase 24 a 27 tras el aislamiento).

Almacenamiento de la exposición virulenta de L. intracellularis N101494

Las formulaciones finales preparadas para la exposición se almacenaron a entre 2°C y 8°C o en hielo hasta la inoculación.

Títulos pre/post- vacunación y exposición

Los resultados del ensayo de la TCID₅₀ verificaron la cantidad de *L. intracellularis* viva administrada a cada animal de prueba por dosis durante la vacunación y la exposición. Los títulos medios (n=5) de las pre y post titulaciones para la vacuna B3903 y el material de exposición (*L. intracellularis* N101494) eran como sigue en la Tabla 6:

TABLA 6

Grupo	Tratamiento (logs/dosis)	logs/dosis medios (2 ml) pre-vacunación (TCID ₅₀ /ml)	logs/dosis medios (2 ml) post-vacunación (TCID ₅₀ /ml)	logs/dosis medios totales
1	Vacuna B3903 dosis alta	6,07	5,89	6,0
2	Vacuna B3903 dosis media	4,94	4,84	4,9
3	Vacuna B3903 dosis baja	3,9	3,5	3,8
4	Controles expuestos	7,85	7,57	7,71

Diseño del estudio

Sesenta y cinco lechones destetados sanos negativos para *L. intracellularis* de 3 semanas de edad se dividieron aleatoriamente en 5 grupos de tratamiento y se alojaron por separado a lo largo de todo el estudio. En el día 0, el grupo de tratamiento 1 (15 cerdos) recibió una dosis de 2 ml (6,0 logs/dosis) de vacuna de B3903 mediante un enjuague oral directo. El grupo de tratamiento 2 (15 cerdos) recibió una dosis de 1 x 2 ml de vacuna de B3903 con un título de 4,9 logs/dosis mediante un enjuague oral directo. El grupo de tratamiento 3 (15 cerdos) recibió una dosis de 1 x 2 ml de vacuna de B3903 con un título de 3,8 logs/dosis mediante un enjuague oral directo.

ES 2 333 334 T3

Los grupos de tratamiento 4 y 5 (10 cerdos/grupo) recibieron una dosis de 1 x 2 ml de placebo mediante un enjuague oral directo.

En el día 21 del estudio (3 semanas después de la vacunación), los cerdos de prueba de los grupos de tratamiento 1 - 4 recibieron una dosis de 1 x 10 ml de un cultivo puro virulento de bajo pase de la cepa clínica heteróloga N101494 de *L. intracellularis* mediante cebado gástrico.

En el día 42 del estudio (3 semanas después de la exposición), todos los grupos de tratamiento (1 - 5) fueron sacrificados, y se les realizó una necropsia para un análisis macroscópico y microscópico de las lesiones de la PPE.

Se realizaron observaciones diarias de la salud desde el día del inicio del estudio hasta el día de la exposición de cada animal de prueba. Se puntuó la salud clínica (diarrea, comportamiento y estado corporal) diariamente desde el día de la exposición (día 21) hasta la finalización del estudio (día 42). Los pesos se tomaron el día de la vacunación (día 0), el día de la exposición (día 21) y el día de finalización del estudio (día 42) para calcular las ganancias de peso medias diarias de cada grupo de tratamiento. La presencia en heces de *L. intracellularis* se evaluó mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comprobando los exudados fecales (f-PCR) en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del estudio. Todos los animales sacrificados al finalizar el estudio (día 42) fueron examinados para comprobar las lesiones macroscópicas y microscópicas. El análisis cualitativo del contenido bacteriano en los tejidos se evaluó mediante PCR (t-PCR) junto con una evaluación histológica de *L. intracellularis* en el íleon, el colon, la amígdala y el nódulo linfático mesentérico el día 42 del estudio. El suero se recogió los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del estudio. El suero se probó usando la prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes (IFAT) para detectar anticuerpos anti-Lawsonia en los animales de prueba. Las comparaciones en el grupo de tratamiento se realizaron mediante el análisis de los datos de las ganancias de peso medias diarias tras la vacunación y tras la exposición, las puntuaciones clínicas, las tasas de seroconversión (IFAT), la colonización (t-PCR), la presencia en heces (f-PCR), y el desarrollo de lesiones macroscópicas y microscópicas mediante inmunohistoquímica (IHC).

Resultados

Resumen de los resultados primarios

TABLA 7

Grupo de tratamiento	Cerdos por grupo	ID del grupo de tratamiento (logs/dosis)	Puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas (íleon)	Puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas (colon)	Puntuaciones medias de las lesiones microscópicas (íleon)	Puntuaciones medias de las lesiones microscópicas (colon)
1	15	vacuna B3903 dosis alta (6,0)	1,5 ab	1,2 a	0,2 ab	0,1 a
2	15	vacuna B3903 dosis media (4,9)	1,2 ab	1,0 a	0,4 ab	0,0 a
3	15	vacuna B3903 dosis baja (3,8)	2,5 b	1,5 b	1,0 b	0,3 a
4	10	Controles expuestos	3,6 c	2,2 b	2,4 c	1,5 b
5	10	Controles estrictos	1,0 a	1,0 a	0,0 a	0,0 a

* Las mismas letras indican una diferencia no significativa ($p < 0,05$)

ES 2 333 334 T3

Los resultados finales de las pruebas para cada grupo de tratamiento revelaron el desarrollo de lesiones macroscópicas y microscópicas significativas en el íleon y el colon en cerdos de control expuestos no vacunados (grupo 4) en comparación con los cerdos vacunados independientemente de la dosis (alta, media y baja) en los grupos 1, 2 y 3 ($p < 0,05$). Las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas del colon con una dosis baja de vacuna no eran significativamente diferentes a los controles expuestos. El grupo con una dosis baja de vacuna (grupo 3) es el único grupo de tratamiento que recibió vacuna y tuvo un desarrollo de lesiones significativo (macroscópicas y microscópicas) en comparación con el grupo de control estricto que no recibió una vacunación, placebo ni exposición a lo largo del estudio.

Puntuaciones clínicas

Se registraron diariamente las puntuaciones clínicas de cada animal desde el día de la exposición (día 21) hasta la necropsia (día 42). Las puntuaciones clínicas se calcularon para obtener una puntuación clínica diaria media que reflejara la gravedad y la duración de la afección entre los grupos de tratamiento debido a la recepción de una exposición virulenta a *L. intracellularis*. Las puntuaciones clínicas medias de cada grupo de tratamiento se resumen en la Tabla 8.

TABLA 8

Grupo de tratamiento	Identificación del grupo	Puntuación clínica media
1	vacuna B3903–dosis alta	3,1 a
2	vacuna B3903–dosis media	3,0 a
3	vacuna B3903–dosis baja	3,0 a
4	Control expuesto	3,0 a
5	Control estricto	3,0 a

* Las mismas letras denotan unas diferencias no significativas entre las puntuaciones clínicas medias desde el día de la exposición hasta la necropsia ($p < 0,05$).

El análisis estadístico de las puntuaciones clínicas se consiguió revisando los datos relacionados con los grupos de tratamiento que recibieron las puntuaciones clínicas medias usando un análisis de la variancia unifactorial. No hubo pruebas de diferencias significativas entre los grupos de control expuestos no vacunados y los controles estrictos en comparación con los grupos vacunados con dosis altas, medias o bajas.

Ganancias de peso medias diarias

Las ganancias de peso medias diarias (ADWG) se calcularon desde el momento de la administración de la vacuna (día 0), hasta la administración de la exposición (día 21), hasta la finalización del estudio (día 42). El análisis estadístico de las diferencias en la ganancia de peso entre los grupos de tratamiento de control expuestos vacunados con dosis altas y no vacunados reveló pruebas de una diferencia significativa desde el momento de la administración de la exposición hasta la necropsia ($p < 0,05$). Los datos del peso se resumen en la Tabla 9.

ES 2 333 334 T3

TABLA 9

Grupo de tratamiento	Identificación del grupo	Peso inicial medio (kg)	ADWG (día 0 - 21) (kg)	ADWG (día 21 - 42) (kg)	ADWG Total (kg) (Vacunación hasta Necropsia)
1	vacuna B3903 dosis alta	8,074 a	0,426 a	0,739 a	0,585 a
2	vacuna B3903 dosis media	8,029 a	0,454 a	0,726 ab	0,590 a
3	vacuna B3903 dosis baja	8,165 a	0,426 a	0,671 ab	0,549 a
4	Control expuesto	8,029 a	0,435 a	0,658 b	0,549 a
5	Control estricto	8,029 a	0,426 a	0,739 ab	0,581 a

* Las mismas letras denotan unas diferencias no significativas entre las ADWG de los grupos de tratamiento desde el día de la vacunación hasta la exposición y desde el día de la exposición hasta la necropsia ($p < 0,05$).

Seroconversión (IFAT)

Se recogieron semanalmente muestras de suero de todos los animales de prueba en cada grupo de tratamiento y se comprobó la presencia de anticuerpos IgG anti-Lawsonia en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del estudio. Las muestras de control IFAT positivas y negativas fueron 100% precisas en todos los ensayos realizados en este estudio. En los días 0 hasta 21 (3 semanas después de la vacunación), todos los animales de prueba de cada grupo de tratamiento dieron negativo en el IFA. En el día 28 (1 semana después de la exposición) del estudio, 1/15 (6,7%) de los animales de prueba del grupo de tratamiento con una dosis alta de vacuna dieron positivo en el IFA mientras que todos los demás dieron negativo en el IFA. En el día 35 (2 semanas después de la exposición) del estudio, 4/15 (26,7%) de los cerdos de los grupos de tratamiento con dosis altas y dosis medias de vacuna y 1/10 (10%) de los cerdos del grupo de tratamiento de control expuestos no vacunados dieron positivo en el IFA para los anticuerpos de Lawsonia. Ambos grupos de tratamiento con una dosis baja de vacuna y de control estricto dieron negativo en el IFA en el día 35. En el día 42 (3 semanas después de la exposición) del estudio, 8/10 (80%) de los cerdos del grupo de control expuesto, 6/15 (40%) de los cerdos del grupo con una dosis media de vacuna, 5/15 (33,3%) de los cerdos del grupo con una dosis baja de vacuna y 3/15 (20%) de los cerdos del grupo con una dosis alta de vacuna dieron positivo en el IFA. El grupo de tratamiento de control estricto dio negativo en el IFA al finalizar el estudio (día 42).

Los datos de seroconversión se analizaron usando la estadística de χ^2 . Para los resultados obtenidos en el grupo de tratamiento de control estricto no se tuvo en cuenta una estadística de χ^2 debido al 100% de respuestas negativas encontradas para cada animal de prueba a lo largo del estudio. En los grupos de tratamiento que recibieron una vacuna o placebo, los resultados del IFAT se compararon usando una estadística de χ^2 con una estimación del valor exacto de p (Monte-Carlo). Los resultados positivos del IFAT obtenidos de los grupos expuestos que recibieron una exposición a un cultivo puro virulento eran significativamente mayores que los que recibieron una dosis alta de vacuna y una dosis baja de vacuna ($p < 0,05$) en el día 42 (3 semanas después de la exposición) del estudio.

Presencia en heces de L. intracellularis (PCR)

Se recogieron semanalmente los exudados fecales de todos los animales de prueba de cada grupo de tratamiento y se comprobó la presencia de *L. intracellularis* mediante PCR en los días 0, 7, 14, 21, 28, 35 y 42 del estudio. La extracción positiva y negativa de ADN y los controles de la reacción de PCR fueron 100% precisos para cada ensayo realizado en este estudio. Todos los animales de prueba de cada grupo de tratamiento dieron negativo en heces mediante PCR para *L. intracellularis* desde el día 0 (vacunación) hasta el día 21 (exposición). Los cerdos del grupo de control estricto permanecieron negativos en heces mediante PCR para *L. intracellularis* en sus heces a lo largo del estudio. La presencia en heces de *L. intracellularis* (PCR fecal positiva) fue evidente en varios grupos de tratamiento cada semana tras la inoculación de la exposición. Estos resultados se resumen en la Tabla 10.

TABLA 10

Grupo de tratamiento	Identificación del grupo	Día 28 (1 semana después de la exposición)	Día 35 (2 semanas después de la exposición)	Día 42 (3 semanas después de la exposición)
1	vacuna B3903 dosis alta	0/15 (0%) a	2/15 (13,3%) a	0/15 (0%) a
2	vacuna B3903 dosis media	6/15 (40%) ab	5/15 (33,3%) a	0/15 (0%) a
3	vacuna B3903 dosis baja	4/15 (26,7%) ab	8/15 (53,3%) ab	2/15 (13,3%) ab
4	Control expuesto	4/10 (40%) b	7/10 (70%) b	4/10 (40%) b
5	Control estricto	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)

* Las mismas letras denotan una diferencia no significativa entre los grupos de tratamiento que recibieron una exposición ($p < 0,05$).

El análisis estadístico usando una estadística de χ^2 con una estimación del valor exacto dep (Monte Carlo) comparó las respuestas positivas de cada grupo de tratamiento vacunado sólo con el grupo de control expuesto no vacunado. Los resultados del grupo de control estricto se retiraron de las comparaciones de grupo porque cada cerdo era 100% negativo en heces mediante PCR para *L. intracellularis* a lo largo del estudio. En el día 28 (1 semanas después de la exposición), los cerdos que recibieron una dosis alta de vacuna tuvieron una presencia en heces de *L. intracellularis* significativamente menor que los cerdos expuestos no vacunados ($p = 0,017$). En el día 35 (2 semanas después de la exposición), los cerdos que recibieron una dosis alta ($p = 0,0024$) y una dosis media ($p = 0,041$) de vacuna tenían una presencia en heces de *L. intracellularis* significativamente menor que los cerdos expuestos no vacunados. En el día 42 (finalización del estudio), de nuevo, los cerdos que recibieron una dosis alta y media de vacuna ($p = 0,017$) tuvieron una presencia en heces de *L. intracellularis* significativamente menor en comparación con los cerdos expuestos no vacunados. Los cerdos del grupo con una dosis baja no eran significativamente menos positivos en la PCR que los controles expuestos en cualquier día después de la exposición.

Colonización tisular por *L. intracellularis* (PCR)

Las pruebas de la Reacción en Cadena de la Polimerasa de las secciones tisulares el íleon terminal, el colon, la amígdala y el nódulo linfático mesentérico se realizaron después de la necropsia (día 42 del estudio). En el grupo con una dosis alta de vacuna, 1/15 (6,7%) de los cerdos dieron positivo en la PCR para la colonización por *L. intracellularis* en la amígdala, mientras que todos los demás grupos de tratamiento dieron negativo en la PCR. La prueba de ileítis mediante PCR del tejido linfático mesentérico reveló que 3/10 (30%) de los cerdos de los controles expuestos no vacunados dieron positivo para la colonización por *L. intracellularis*, mientras que todos los demás grupos de tratamiento dieron negativo en la PCR. La prueba de ileítis mediante PCR de los raspados de la mucosa del íleon terminal revelaron que 4/10 (40%) de los cerdos de los controles expuestos, 4/15 (26,7%) de los cerdos del grupo con una dosis baja de vacuna, 2/15 (13,3%) de los cerdos del grupo con una dosis media de vacuna y 1/15 (6,7%) de los cerdos con una dosis alta de vacuna dieron positivo en la PCR para la colonización por *L. intracellularis*. La prueba de ileítis mediante PCR del colon reveló que 3/10 (30%) de los cerdos de los controles expuestos, 5/15 (33,3%) de los cerdos del grupo con una dosis baja de vacuna, 1/15 (6,7%) de los cerdos del grupo con una dosis media de vacuna y 2/15 (13,3%) de los cerdos con una dosis alta de vacuna eran positivos mediante PCR para la colonización por *L. intracellularis*. No se observaron pruebas de colonización por *L. intracellularis* en los tejidos del grupo de control estricto.

El análisis estadístico de los resultados positivos de la ileítis mediante PCR se comparó con los grupos de tratamiento usando la estadística de χ^2 con una aproximación de Monte Carlo del valor exacto de p. Los resultados mediante PCR del nódulo linfático mesentérico indicaron pruebas de una diferencia significativa entre los controles expuestos no vacunados y todos los grupos de tratamiento que recibieron un tratamiento con vacuna ($p = 0,054$). No hubo ninguna significación estadística evidente entre los grupos de tratamiento en la colonización por *L. intracellularis* del íleon, el colon o la amígdala en el día 42 del estudio.

Histología (IHC/H&E)

En la necropsia (día 42) se recogieron secciones de 2 a 4 cm de longitud de la amígdala, el nódulo linfático mesentérico, el íleon terminal y el colon, y se colocaron en formalina tamponada al 10% para su análisis histológico. *Lawsonia intracellularis* no se detectó mediante una tinción por IHC de las secciones de la amígdala en todos los grupos de tratamiento en la necropsia. El grupo de control estricto dio negativo para *L. intracellularis* mediante IHC en todas las muestras de tejido tomadas en la necropsia. Se encontró la presencia de *L. intracellularis* y de lesiones microscópicas asociadas con la PPE en el íleon de 9/10 (90%) de los cerdos de los controles expuestos no vacunados, en 6/15 (40%) de los cerdos del grupo con una dosis baja de vacuna, en 3/15 (20%) de los cerdos del grupo con una dosis media de vacuna y en 1/15 (6,7%) de los cerdos del grupo con una dosis alta de vacuna, respectivamente. Las lesiones microscópicas eran evidentes en el colon de 8/10 (80%) de los cerdos del grupo de control expuesto, en 3/15 (20%) de los cerdos del grupo con una dosis baja de vacuna y en 1/15 (6,7%) de los cerdos del grupo con una dosis alta de vacuna. El grupo vacunado que recibió una dosis media dio negativo mediante IHC para *L. intracellularis* en el colon. Las secciones teñidas del nódulo linfático mesentérico sólo se produjeron en 1/10 (10%) de los cerdos del grupo de control expuesto que tenían *L. intracellularis*. Los resultados positivos mediante IHC en las secciones del íleon y del colon entre los grupos de tratamiento se correlacionaban bien con la presencia de una acusada hiperplasia de las criptas demostrada mediante una metodología de H&E.

El análisis estadístico de los datos cuantitativos de IHC se consiguió usando las pruebas de análisis de la variancia unifactorial y de la suma por rangos de Kruskal-Wallis, seguidas de contrastes específicos de los valores de p entre el grupo expuesto y los grupos de control estricto con cada grupo de dosis de vacuna. El análisis estadístico reveló pruebas del desarrollo de una lesión significativa debida a *L. intracellularis* en el íleon y el colon del grupo de control expuesto en comparación con los cerdos vacunados independientemente de la dosis en el día 42 del estudio ($p < 0,001$). No hubo una significación estadística evidente en las puntuaciones medias de las lesiones mediante IHC del íleon y del colon en animales vacunados que recibieron una dosis alta o media de la vacuna en comparación con el grupo de tratamiento de control estricto ($p > 0,05$). Los cerdos que recibieron una dosis baja de vacuna tuvieron unas puntuaciones medias de las lesiones microscópicas debidas a *L. intracellularis* significativamente mayores en el íleon en comparación con el grupo de control estricto ($p < 0,05$).

Puntuaciones macroscópicas

El íleon y el colon de cada animal de prueba se puntuaron en el momento de la necropsia (día 42) para las lesiones macroscópicas asociadas con la PPE. Los tejidos de los cerdos de prueba del control estricto eran normales, no contenían lesiones, y recibieron unas puntuaciones medias de las lesiones de 1,1 (íleon) y 1,0 (colon). Los tejidos de los animales de prueba del grupo de control expuesto no vacunados recibieron la puntuación media de las lesiones macroscópicas más alta para el íleon (3,6) y el colon (2,0) de entre los grupos de tratamiento. Los cerdos de prueba del grupo con una dosis baja de vacuna recibieron unas puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas de 2,5 (íleon) y 1,5 (colon). Los cerdos de prueba con una dosis media de vacuna recibieron unas puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas de 1,5 (íleon) y 1,0 (colon). Los tejidos del grupo con una dosis alta de vacuna recibieron unas puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas de 1,5 (íleon) y 1,2 (colon).

El análisis estadístico de las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas entre los grupos de tratamiento se consiguió usando un análisis de la variancia unifactorial. Las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas indicaron pruebas de una diferencia significativa entre el íleon del grupo de control expuesto no vacunado y los grupos con una dosis media y alta de vacuna, respectivamente ($p < 0,001$). Se observaron pruebas de una diferencia significativa entre las puntuaciones medias del íleon macroscópico del control expuesto en comparación con el grupo con una dosis baja de vacuna ($p < 0,01$). Las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas del colon fueron significativamente mayores en el grupo de control expuesto en comparación con los grupos con una dosis media y alta de vacuna, respectivamente ($p < 0,05$). Además, se observó el desarrollo de una significativa lesión macroscópica en el íleon del grupo vacunado con una dosis baja en comparación con el grupo de control estricto ($p < 0,001$). No hubo pruebas de una significación estadística en las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas (íleon y colon) evidentes en los grupos con una dosis media y alta de vacuna en comparación con el grupo de tratamiento de control estricto.

Conclusiones

Este estudio demostró que la protección en cerdos de 3 semanas de edad frente a la PPE se consiguió cuando se administraba una dosis por vía oral de 2 ml de una vacuna de B3903 (liofilizada) que contiene un mínimo de 4,9 logs de *L. intracellularis* vivas por dosis. Una protección similar, e incluso ligeramente mejor, fue evidente en el grupo de tratamiento con una dosis alta de vacuna que recibió 6,0 logs/dosis 3 semanas antes de la exposición. El grupo con una dosis baja de vacuna (3,8 logs/dosis) no mostró una protección adecuada frente a una exposición heteróloga de cultivo puro virulento en comparación con los animales de prueba que recibieron una dosis alta o media de la vacuna experimental. Las diferencias estadísticas fueron evidentes entre el grupo con una dosis baja de vacuna y los controles expuestos no vacunados con respecto a la gravedad de las lesiones microscópicas en el íleon y el colon ($p < 0,001$) y las puntuaciones medias de las lesiones macroscópicas del íleon ($p < 0,01$). Sin embargo, se observaron unas lesiones de PPE significativas en el íleon (lesiones microscópicas) y el colon (lesiones macroscópicas) en este grupo en comparación con el grupo de control estricto que no recibió vacuna ni exposición.

ES 2 333 334 T3

En resumen, los datos de este estudio demuestran que: (1) el título protector mínimo de una administración oral única de una vacuna de B3903 (liofilizada) a cerdos de 3 semanas de edad es de 4,9 logs/dosis; (2) la vacuna B3903 (liofilizada) es eficaz frente a un cultivo puro virulento de bajo pase de *L. intracellularis*, cepa clínica heteróloga N101494; y (3) la vacuna B3903 (liofilizada) contribuye a la reducción de las lesiones macroscópicas y microscópicas, de la colonización tisular y de la presencia en heces de *L. intracellularis* en cerdos vacunados en comparación con cerdos no vacunados.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 333 334 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una cepa clínica virulenta de *Lawsonia intracellularis*, en la que dicha cepa clínica virulenta es la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* depositada en la ATCC con el nº PTA-4927 o cualquier cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* de origen europeo, **caracterizada** porque dicha *Lawsonia intracellularis* avirulenta no provoca la presencia en heces el día 14 después de la vacunación.
- 10 2. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz de una *Lawsonia intracellularis* avirulenta según la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. La vacuna según la reivindicación 2, en la que la cantidad farmacéuticamente eficaz de la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* es de una TCID₅₀ de 10³ hasta una TCID₅₀ de 10⁶ por dosis.
- 15 4. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1 y material antigénico procedente de al menos uno de los siguientes patógenos: especies del género *Salmonella*, especies del género *Erysipelothrix*, especies del género *Haemophilus*, especies del género *Mycoplasma*, especies del género *Leptospira*, especies del género *Clostridium*, especies del género *Streptococcus*, especies del género *Brachyspira*, circovirus, virus del síndrome reproductor y respiratorio porcino (PRRS), virus de la gripe porcina (SIV), virus transmisible de gastroenteritis (TGE), parvovirus y *Escherichia coli*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 20 5. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1 y material antigénico procedente de *Salmonella choleraesuis*, especies del género *Erysipelothrix*, virus transmisible de gastroenteritis (TGE), *Escherichia coli*, especies del género *Clostridium* y especies del género *Brachyspira*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 25 6. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1 y material antigénico procedente de *Salmonella choleraesuis* y especies del género *Erysipelothrix*; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 30 7. Una vacuna para la inmunización de un animal, que comprende la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1 y material antigénico procedente de al menos uno de los siguientes patógenos: especies del género *Clostridium*, virus de la gripe equina (EIV), virus del herpes equino (EHV), alfavirus y virus del Nilo occidental; y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 35 8. La cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* patógena según la reivindicación 1, para uso como una vacuna.
- 40 9. La cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* patógena según la reivindicación 8, para uso como una vacuna para proteger a un animal frente a la enteropatía proliferativa porcina.
- 45 10. Un método para elaborar una vacuna para inducir una respuesta inmune ante bacterias de *Lawsonia intracellularis* en un animal, que comprende las etapas de: (a) incubar una cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1 en células de cultivo que están en suspensión con una concentración de oxígeno de menos de aproximadamente el 10 por ciento para cultivar dichas bacterias; y (b) mezclar dichas bacterias cultivadas con un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 11. Un método para cultivar *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1, que comprende:
- (a) infectar células cultivadas con un inóculo que comprende la cepa clínica avirulenta de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1,
 - (b) incubar dichas células infectadas con una concentración de oxígeno de menos del 10 por ciento mientras se mantienen dichas células infectadas en suspensión mediante la agitación de dichas células, y
 - (c) recolectar al menos una porción de dicha *Lawsonia intracellularis*.
- 55 12. El método según la reivindicación 11, en el que la concentración de oxígeno está en el intervalo del 0 por ciento al 8 por ciento.
- 60 13. El método según la reivindicación 12, en el que la concentración de oxígeno está en el intervalo del 0 por ciento al 3 por ciento.
- 65 14. El método según la reivindicación 11, en el que dicha incubación se produce con una concentración de dióxido de carbono en el intervalo de 6 por ciento al 10 por ciento.

ES 2 333 334 T3

15. El método según la reivindicación 11, en el que dichas células cultivadas se eligen del grupo formado por: células HEp-2, McCoy e IEC-18.

16. El método según la reivindicación 11, en el que dichas células IEC-18 se cultivan en microvehículos.

17. El método según la reivindicación 11, en el que las células infectadas se incuban según la etapa (c) durante un periodo de 2 hasta 10 días.

18. El método según la reivindicación 11, que comprende, además, una etapa (d) de liofilizar dichas bacterias recolectadas.

19. El método según la reivindicación 18, en el que dicha liofilización comprende una etapa primaria de secado y una etapa secundaria de secado.

20. Un método para el diagnóstico de la enteropatía proliferativa porcina, que comprende realizar un ensayo para detectar anticuerpos contra *Lawsonia intracelluris* en un sujeto animal no humano, que comprende:

(a) poner en contacto una muestra del sujeto con la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* según la reivindicación 1 para formar un complejo antígeno-anticuerpo; y

(b) detectar la formación de dicho complejo,

en el que la presencia de dicho complejo se correlaciona positivamente con un diagnóstico de la enteropatía proliferativa porcina.

21. El método según la reivindicación 20, en el que el ensayo comprende un ensayo elegido del grupo formado por: radioinmunoensayo, ensayo de inmunosorción enzimática (ELISA), inmunoensayo de fluorescencia y ensayo de inmunoelectroforesis.

22. Un método para producir antisueros contra *Lawsonia intracelluris* en un animal no humano, que comprende:

(a) administrar la cepa clínica de *Lawsonia intracellularis* de la reivindicación 1 a un animal no humano en una cantidad eficaz para desencadenar una respuesta inmune; y

(b) recoger el suero o el plasma que contiene los anticuerpos contra dicha *Lawsonia intracellularis*.