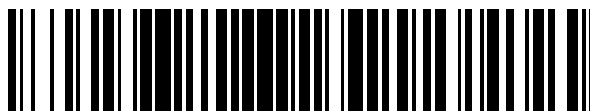


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 576**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07727888 .5**
96 Fecha de presentación: **06.04.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2007419**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **31.12.2008**

54 Título: **Vacuna contra microplasma PRRV**

30 Prioridad:
10.04.2006 EP 06112444
10.04.2006 US 791094 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.03.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.03.2012

73 Titular/es:
INTERVET INTERNATIONAL BV
WIM DE KORVERSTRAAT 35 P.O. BOX 31
5830 AA BOXMEER, NL

72 Inventor/es:
DREXLER, Christa Sibilla y
WITVLIET, Maarten

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 377 576 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacuna contra micoplasma PRRV

5 La presente invención se refiere al uso de una dosis inmunogénica de material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y a una dosis inmunogénica de virus PRRS atenuados vivos para la fabricación de una vacuna.

10 La neumonía por micoplasmas porcina causada por el patógeno bacteriano *Mycoplasma hyopneumoniae* es una enfermedad respiratoria crónica extendida que se produce en cerdos. Especialmente los cerdos jóvenes son vulnerables a esta enfermedad no mortal. La neumonía enzoótica es una enfermedad crónica que tiene como resultado una mala conversión del alimento y detención del crecimiento. La enfermedad es muy contagiosa y la transmisión suele ser a través del contacto directo con secreciones del tracto respiratorio infectado, por ejemplo en forma de gotas infectadas tras toser/estornudar.

15 La consecuencia más problemática de esta enfermedad es que predispone a todos los tipos de infecciones secundarias del sistema respiratorio.

20 Se ha estimado que, por ejemplo, en EE.UU. el 99% de todas las granjas de cerdos están infectadas. Todos los años se estiman pérdidas entre 100 y 300 millones de dólares.

25 Otra enfermedad respiratoria muy frecuente en cerdos es la enfermedad habitualmente conocida como Síndrome Respiratorio Reproductor Porcino (PRRS) y como Síndrome respiratorio y de aborto epidémico porcino (PEARS). Actualmente, la enfermedad se denomina en todo el mundo PRRS. La patología no está restringida solo a la enfermedad respiratoria, sino también al aborto. Otros síntomas, vistos habitual u ocasionalmente con la enfermedad son: OFF FEED, anorexia, decoloración azulada de las extremidades, especialmente las orejas.

30 El agente causante de la enfermedad se sabe ahora que es un virus de ARN con una pequeña cubierta. En hembras reproductoras, el PRRS produce fiebre, depresión y disminución del apetito en cerdas adultas y nulíparas. Después se producirán problemas reproductores y afectan principalmente a las hembras en la última etapa de la gestación.

35 En cerdos jóvenes, el PRRS afecta principalmente al sistema respiratorio. Se observa una respiración anormalmente rápida o "descomunal". La gravedad de los problemas por otros patógenos bacterianos y víricos a menudo parecen intensificarse, con pérdidas por muerte y costes derivados del tratamiento. A ello le puede seguir un rendimiento escaso, ya que los cerdos pueden durar semanas adicionales.

40 Además de las enfermedades observadas con frecuencia producidas por *Mycoplasma hyopneumoniae* y el virus de PRRS, en la actualidad cada vez con mayor frecuencia se observa un trastorno respiratorio económicamente significativo. Este trastorno se caracteriza por un crecimiento lento, disminución de la eficiencia de la alimentación, letargo, anorexia, fiebre, tos y disnea. Ahora se conoce normalmente como complejo de enfermedad respiratoria porcina (PRDC) y los dos patógenos más habituales aislados en cerdos que sufren PRDC son *Mycoplasma hyopneumoniae* y el virus de PRRS. Aparentemente, la enfermedad se debe a alguna acción combinada de los dos patógenos.

45 La industria de la cría de cerdos se beneficia de las vacunas eficaces disponibles actualmente contra la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* así como contra la infección por el virus PRRS. Y dado que los cerdos jóvenes son especialmente vulnerables a la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* así como a la infección por el virus PRRS, parecería más eficiente vacunarlos contra ambas enfermedades al mismo tiempo.

50 No obstante, con el paso de los años se ha puesto de manifiesto que esto no es una opción. Se ha establecido el hecho de que la eficacia de las vacunas contra *Mycoplasma hyopneumoniae* disminuye significativamente si los cerdos se infectan o vacunan con el virus del PRRS. Este efecto se observa si la infección o vacunación contra el virus PRRS tiene lugar durante la vacunación, o incluso 1-2 semanas después de la vacunación con una vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Incluso las cepas no virulentas del virus PRRS de la vacuna muestran este efecto (Pig International 30: 9-12 (2000), Thacker, E. L. y col., J. Clin. Microbiol. 37: b20-627 (1999), Thacker, E. L. y col., Vaccine 18: 1244-1252 (2000)).

55 Además, se ha mostrado que la infección por PRRS induce un inicio muy rápido de la patología de una infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

60 Además, la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* aumenta la duración y la gravedad de las infecciones víricas en general, tales como PRSS (Thacker, E.L. y col., Vaccine 18: 1244-1252 (2000)) y la gripe porcina (Thacker, E.L. y col., J. Cl. Microbiol. 39: 2525-2530 (2001)). Este es un motivo más para vacuna contra infecciones víricas, tales como PRRS y gripe porcina, lo antes posible tras el nacimiento, pero, en cualquier caso, antes de que *Mycoplasma hyopneumoniae* golpee.

65

Por tanto, por los motivos mencionados anteriormente, existe una gran preferencia para vacunar primero con la vacuna contra el virus de PRRS en lugar de aplicar una vacunación contra el virus de PRRS y una vacunación contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. No obstante, como consecuencia, hay que esperar hasta que la cepa de virus vivos atenuados de la vacuna contra PRRS haya desaparecido del cuerpo. Esto significa que hay que esperar al menos de dos a tres semanas y, preferentemente más, antes de que una primera vacuna (primovacuna) contra *Mycoplasma hyopneumoniae* pueda administrarse de forma segura, e incluso cuatro semanas y, preferentemente más, antes de administrar la segunda vacunación (vacunación de refuerzo) con la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. Como otra consecuencia, los lechones permanecerán desprotegidos contra la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* durante al menos cuatro semanas tras la vacunación contra el PRRS.

No obstante, actualmente no hay ningún modo de sortear estas indeseadas consecuencias.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una solución al problema mencionado anteriormente.

Sorprendentemente, en la actualidad se ha descubierto que si los lechones se vacuna primer con *Mycoplasma hyopneumoniae*, seguido de una segunda vacunación con *Mycoplasma hyopneumoniae* y un virus atenuado vivo del PRRS, desarrollan con rapidez una protección excelente contra la infección por el virus del PRRS y la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae* e, incluso más inesperadamente, sin reacciones adversas significativas.

Este nuevo enfoque tiene la gran ventaja sobre el procedimiento preferido en la actualidad de que, en un periodo muy corto de tiempo tras el nacimiento, los lechones pueden estar completamente protegidos contra la infección por el virus del PRRS y la infección por *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Aparentemente, si una dosis inmunogénica de material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y una dosis inmunogénica de virus vivos atenuados del PRRS se administran de un modo combinado a los cerdos que han recibido primovacuna con la vacuna frente a *Mycoplasma hyopneumoniae*, se sortean los problemas conocidos.

El material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* puede ser, por ejemplo, una bacterina, o puede ser una subunidad inmunogénica. Igualmente puede ser un virus de vector recombinante vivo o un vector bacteriano distinto a *Mycoplasma hyopneumoniae* capaz de expresar un material genético que codifica una subunidad inmunogénica de *Mycoplasma hyopneumoniae*.

En la técnica se conoce una dosis inmunogénica como la cantidad de material inmunogénico que es, posiblemente en combinación con un adyuvante, suficiente para desencadenar una respuesta inmunitaria en el animal diana.

Por tanto, una primera realización de la presente invención se refiere al uso de una dosis inmunogénica de material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y a una dosis inmunogénica de virus PRRS atenuados vivos para la fabricación de una vacuna para usar en la administración combinada de la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y la vacuna V contra el PRRS a cerdos primovacunados con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

Desde un punto de vista económico, las bacterinas de *Mycoplasma hyopneumoniae* son eficaces, fáciles de fabricar, seguras y baratas. Por tanto, la mayoría de las vacunas frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* disponibles comercialmente se basan en bacterinas.

Por tanto, una forma preferida de esta realización se refiere al uso de una dosis inmunogénica de bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae* y a una dosis inmunogénica de virus vivos atenuados del PRRS para la fabricación de una vacuna para usar en la administración combinada de la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y la vacuna V contra el PRRS a cerdos primovacunados con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

En la técnica, la expresión "bacterina" se refiere a bacterias inactivadas. Dicha inactivación puede realizarse, por ejemplo, por medio de tratamiento químico, tal como, por ejemplo, tratamiento con formalina, tratamiento térmico, tratamiento en una prensa francesa y radiación.

Un virus vivo atenuado del PRRS es un virus de PRRS que es no patogénico para el animal diana o exhibe una reducción sustancial de virulencia en comparación con el virus silvestre.

Aunque preferido, el material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y el virus vivo atenuado del PRRS de la vacuna para usar en la administración combinada no tiene que administrarse necesariamente en forma mixta, es decir mezclados. El motivo de esto es que la vía de administración de cada uno de los componentes activos puede diferir, dependiendo de, por ejemplo, la formulación de los componentes, el alojamiento de los cerdos y la explotación porcina. El material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* (también denominado el componente *Mycoplasma hyopneumoniae*) se puede administrar por vía, por ejemplo, oral, intranasal o por medio de inyección. El virus vivo atenuado del PRRS (también denominado el componente PRRSV) puede administrarse, por ejemplo a efectos de eficiencia, mediante aplicación intradérmica y no necesariamente mediante administración intramuscular. Por tanto, dependiendo de las circunstancias en una granja y de las instrucciones del fabricante de la vacuna, muy bien puede ser que la vía de administración para los componentes *Mycoplasma hyopneumoniae* y PRRSV de la

vacuna sea diferente. Está claro que en dichos casos, la administración de los componentes *Mycoplasma hyopneumoniae* y PRRSV tienen lugar necesariamente en momentos de tiempo ligeramente diferentes. Las ventajas de la presente invención pueden alcanzarse si los componentes *Mycoplasma hyopneumoniae* y PRRSV de la vacuna para usar en la administración combinada se administran en un tiempo relativamente pequeño de tiempo de, por ejemplo, menos de 24 horas, preferentemente menos de 8 horas. Por motivos prácticos, el intervalo será, en la práctica, preferentemente incluso menor; menos de 4 horas, menos de 2 horas, menos de una hora, menos de 30 minutos, menos de 15 minutos, menos de 10 minutos, menos de 5 minutos o menos de 2 minutos, en dicha orden de preferencia.

10 Por tanto, la administración combinada se considera la administración de los componentes *Mycoplasma hyopneumoniae* y PRRSV en un intervalo de tiempo relativamente pequeño inferior a 24 horas; inferior a 8 horas, inferior a 4 horas, inferior a 2 horas, inferior a una hora, inferior a 30 minutos, inferior a 15 minutos, inferior a 10 minutos, inferior a 5 minutos o inferior a 2 minutos, en dicho orden de preferencia.

15 Una realización preferida de la invención se refiere al uso de una dosis inmunogénica de material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y a una dosis inmunogénica de virus PRRS atenuados vivos para la fabricación de una vacuna para usar en la administración combinada de la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y la vacuna V contra el PRRS a cerdos primovacunados con *Mycoplasma hyopneumoniae*, en la que la vacuna para usar en la administración combinada comprende el componente de PRRSV y el componente de *Mycoplasma hyopneumoniae* en forma mixta.

25 Se han encontrado diferencias significativas en la forma antigénica y genotípica entre las cepas de virus del PRRS europeo y norteamericano. Las características de las cepas del virus del PRRS y cómo difieren de las cepas de Norteamérica son bien conocidas en la técnica. Las diferencias entre las cepas del virus del PRRS de Europa y Norteamérica se han descrito en Meng, X. -J. y col., Arch. Virol. 140: 745 -755 (1995), en Suarez, P. y col., Virus Research 42: 159-165 (1996) y en Allende, R. y col., J. Gen Virol. 80: 307 -315 (1999). Durante los últimos años ha quedado claro que la protección cruzada entre las cepas del virus del PRRS de Europa y Norteamérica es insuficiente o incluso inexistente.

30 Por tanto, otra forma preferida de esta realización de la presente invención se refiere al uso de una dosis inmunogénica de material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y a una dosis inmunogénica de virus PRRS atenuados vivos para la fabricación de una vacuna para usar en la administración combinada de la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y la vacuna contra el PRRSV a cerdos primovacunados con *Mycoplasma hyopneumoniae*, en la que el virus atenuado vivo del PRRS es de una cepa europea. Esto es especialmente ventajoso para controlar y disminuir el número de casos europeos del complejo de la enfermedad respiratoria porcina.

40 En otra forma preferida de esta realización, en la fabricación de la vacuna para usar en la administración combinada de vacunas contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y la vacuna contra PRRSV, se añaden uno o más antígenos derivados de otros organismos patogénicos o virus, o información genética que codifica dichos antígenos.

45 Dichos organismos y virus se seleccionan preferentemente del grupo de virus de la seudorrabia, virus de la gripe porcina, parvovirus porcino, virus de la gastroenteritis transmisible, rotavirus, *Escherichia coli*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Lawsonia intracellularis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Salmonella choleraesuis*, *Haemophilus parasuis*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Actinobacillus pleuropneumoniae*

50 No hace falta mencionar que, en principio, también se pueden añadir bacterias o virus de este grupo a la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* para la primovacunación, siempre que no interfieran de forma adversa en los efectos beneficiosos del uso de acuerdo con la invención.

55 Un ejemplo del uso de la presente invención se refiere a un kit de vacuna que comprende la vacuna para usar en la administración combinada en una forma en la que el componente *Mycoplasma hyopneumoniae* está presente en un contenedor, preferentemente en suspensión, y el componente PRRSV está presente en un segundo contenedor, preferentemente en forma liofilizada. La ventaja de este kit es la siguiente: el componente *Mycoplasma hyopneumoniae* se puede aspirar del primer contenedor mediante una aguja de una jeringuilla y, después, se puede añadir al segundo contenedor para disolver el componente PRRSV liofilizado. A continuación, esta mezcla estaría lista para la administración combinada.

60 Como alternativa, el kit de vacuna comprende una vacuna para usar en administración combinada en la que el componente PRRSV y el componente *Mycoplasma hyopneumoniae* están en un contenedor. Dicho contenedor puede ser, por ejemplo, un vial de vacuna. Dichos componentes están en el mismo contenedor, no necesariamente tienen que estar ya mezclados. Por ejemplo, pueden estar separados por una barrera, por ejemplo una membrana, antes de la administración. En el momento de la administración, la aguja de la jeringuilla para administrar puede perforar la membrana, tras lo cual se mezclarán los componentes. Posteriormente, los componentes se pueden usar como mezcla para llenar la jeringuilla y administrar como una mezcla. Los componentes también pueden estar presentes en forma de distintas tortas liofilizadas o cuerpos liofilizados en uno

y el mismo vial. Por tanto, la adición de un diluyente induciría la mezcla de los componentes antes de la administración.

5 Por consiguiente, otra forma de esta realización se refiere a un kit de vacuna que comprende una vacuna para usar en la administración combinada de material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y de virus vivos atenuados del PRRS de acuerdo con la invención, en el que el componente *Mycoplasma hyopneumoniae* y el componente del PRRSV están presentes en un único contenedor.

10 Los cerdos primovacunados con *Mycoplasma hyopneumoniae* son cerdos vacunados con una vacuna frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* antes de la administración combinada de una vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y PRRSV. Como resultado de la primovacunación de los cerdos se forma una respuesta inmunitaria primaria contra *Mycoplasma hyopneumoniae*. El desarrollo de dicha respuesta inmunitaria requiere algún tiempo. No obstante, para la vacuna para usar en la administración combinada de *Mycoplasma hyopneumoniae* y virus del PRRS para desarrollar su eficacia, tiene que haber una reacción inicial adecuada contra *Mycoplasma*
15 *hyopneumoniae*. Por tanto, preferentemente, la vacuna para usar en la administración combinada de *Mycoplasma hyopneumoniae* y virus del PRRS se administraría 7 o más días después de la primovacunación del cerdo

La administración combinada de la vacuna *Mycoplasma hyopneumoniae* y PRRS se realizaría, preferentemente, en 20 35 días después de la primovacunación, más preferentemente en 14-35 días después de la primovacunación: siempre que la vacuna para usar en la administración combinada de *Mycoplasma hyopneumoniae* (vacunación de refuerzo) y el virus del PRRS no se administre, los cerdos no están completamente protegidos contra la infección por ni tampoco contra la infección por el virus del PRRS. Por tanto, preferentemente, la administración de la vacuna para usar en administración combinada se realiza entre 7 y 35 días tras la primovacunación con *Mycoplasma hyopneumoniae*, más preferentemente entre 14 y 35 días, incluso más preferentemente entre 21 y 28 días después
25 de la primovacunación con *Mycoplasma hyopneumoniae*.

No hace falta mencionar que para la primovacunación de los cerdos que se van a vacunar, son adecuadas, con mucho, las vacunas contra *Mycoplasma hyopneumoniae*.

30 Las vacunas contra micoplasma se han divulgado en, por ejemplo, la solicitud PCT WO 91/8627, la patente de EE.UU. US 5,338,543 y la patente europea EP 550.477.

Dichas vacunas, principalmente bacterinas, también están disponibles comercialmente con facilidad en diversos fabricantes. Ejemplos de vacunas de *Mycoplasma hyopneumoniae* disponibles comercialmente son Porcilis® M
35 Hyo, ProSystem® M (Porcilis® M) (Intervet Int. BY), ProSystem® BPM, (Porcilis® BPM) (Intervet Int. BY), RespiSure® (Pfizer), Stellamune® (Pfizer), Suvaxyne® M.hyo (Fort Dodge), Hyoresp® (Merial) y M+Pac® (Schering-Plough).

40 Para el componente *Mycoplasma hyopneumoniae* que se usa en la fabricación de la vacuna para usar en la administración combinada de acuerdo con la invención se aplica lo mismo. Se pueden usar fácilmente las vacunas contra micoplasma como se divulgan en, por ejemplo, la solicitud PCT WO 91/18627, la patente de EE.UU. US 5.338.543 y la patente europea EP 550.477. En principio, las vacunas contra micoplasma disponibles comercialmente, como las descritas anteriormente, también son adecuadas.

45 Con respecto al componente PRRSV de la vacuna para usar en la fabricación de la vacuna para usar en la administración combinada de acuerdo con la invención, se pueden usar fácilmente vacunas con virus vivos atenuados del PRRS como se divulgan en, entre otras, las patentes europeas EP 676.467, EP 835.930, las patentes de EE.UU. US 5,510,258 y US 5,587,164. En principio, las vacunas contra el PRRS disponibles comercialmente, como las disponibles en, por ejemplo, Intervet Int. B. V., por ejemplo, Porcilis® PRRS, también se pueden usar con
50 eficiencia. Por tanto, el experto en la técnica no experimentará ningún problema al seleccionar el componente *Mycoplasma hyopneumoniae* y el componente de virus vivos atenuados del PRRS que forman los componentes básicos necesarios para la fabricación de la vacuna para usar en la administración combinada de acuerdo con la invención ni experimentará ningún problema al seleccionar la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* para la primovacunación.

55 El experto en la técnica sabrá administrar las vacunas. Tanto la dosis como las vías de administración de la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y la vacuna de virus vivos atenuados frente al PRRS evidentemente parten de las instrucciones proporcionadas el fabricante en el caso de que se usen los componentes de una vacuna comercial o en caso de una vacuna no comercial, a partir de los procedimientos divulgados en, por ejemplo, cualquiera de las
60 patentes mencionadas anteriormente.

Simplemente como ejemplo: Si el experto en la técnica escoge Porcilis® M Hyo como vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y Porcilis® PRRS como vacuna contra el PRRS, una primovacunación con una dosis de 2 ml se administrará, preferentemente, a los 5-9 días de edad y la administración de la vacuna para usar en la
65 administración combinada de la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y la vacuna de virus vivos atenuados contra el PRRS de acuerdo con la invención se realizará, preferentemente, a los 23-30 días de edad.

Otra realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para la vacunación de cerdos contra la infección por PRRS y *Mycoplasma hyopneumoniae*, en el que el procedimiento comprende las etapas de administrar una primera vacunación (una primovacuna) con una vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae*, seguido de una vacunación combinada con material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y un virus vivo atenuado del PRRS. Por tanto, la vacunación combinada funciona con respecto al material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* como segunda vacunación (un refuerzo).

El efecto beneficioso de una vacuna para usar en la administración combinada de la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y el PRRSV a cerdos primovacunados con la vacuna frente a *Mycoplasma hyopneumoniae* se ilustra mediante los Ejemplos que se proporcionan a continuación (no restrictivos).

Ejemplos

Ejemplo 1

La eficacia del uso simultáneo de una bacterina de *M. hyopneumoniae* (Porcilis® M Hyo) y una vacuna con virus vivos modificados de PRRS (Porcilis® PRRS) se analizó en un experimento de exposición a vacunación en lechones SPF de acuerdo con el siguiente diseño experimental:

grupo	n	1ª vacunación a 1 semana de edad	2ª vacunación a las 4 semanas de edad	Exposición
1	12	M. hyo	M. hyo + PRRS	M. hyopneumoniae a las 6 semanas de edad
2	12	M. hyo	M. hyo	
3	12	-	-	
4	7	M. hyo	M. hyo + PRRS	PRRSV a las 8 semanas de edad
5	6	-	PRRS	
6	6	-	-	

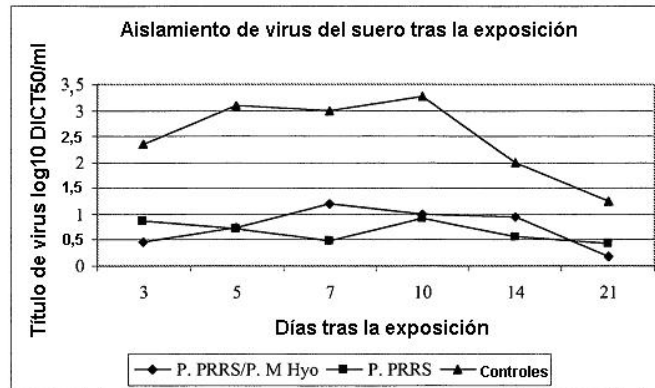
La vacuna contra *M. hyopneumoniae* se administró como una dosis intramuscular de 2 ml y la cepa de la vacuna liofilizada contra el PRRS también se administró como una dosis intramuscular de 2 ml tras la reconstitución en diluyente (Diluvac Forte, Intervet Int. B.V., Wim de Korverstraat 35, Boxmeer, Países Bajos) (grupo 5) o en la vacuna contra *M. hyopneumoniae* (grupos 1 y 4). Durante el experimento, una serie de lechones murieron por motivos no relacionados con la vacunación o la exposición a la infección.

La exposición a *M. hyopneumoniae* se realizó mediante inoculación intratraqueal de los lechones con 10^{8.5} UCC de un cultivo de pase bajo de aislamiento de campo de *M. hyopneumoniae* dos días seguidos. Tres semanas después, se realizó la necropsia de los cerdos y se puntuó las lesiones pulmonares consolidadas de acuerdo con Goodwin & Whittlestone (British Vet. Journ. 129: 456 -464 (1973)). La reducción de las lesiones pulmonares específicas de *M. hyopneumoniae* fue estadísticamente significativa para los grupos 1 y 2 en comparación con los controles. La diferencia entre los grupos 1 y 2 no fue estadísticamente significativa (p= 0,83, prueba U de Mann-Whitney).

grupo	N	1ª vacunación a 1 semana de edad	2ª vacunación a las 4 semanas de edad	Puntuación de las lesiones por <i>M. hyopneumoniae</i> *
1	12	M. hyo	M. hyo + PRRS	3,7 ^a
2	1	M. hyo	M. hyo	5,9 ^a
3	11	-	-	13,4 ^b

*: La puntuación máxima de la lesión es 55; los grupos con diferentes superíndices son significativamente diferentes (p<0,05, prueba U de Mann-Whitney)

La exposición al PRRSV se realizó mediante instilación intranasal de 10⁵ DICT₅₀ en 1 ml de PBS por fosa nasal de una cepa de PRRSV silvestre. Los días 3, 5, 7, 10, 14 y 21 tras la exposición, se extrajeron muestras de sangre de todos los lechones para titulación del virus en macrófagos alveolares (PAM) de cerdo. Brevemente, las monocapas de PAM en placas de 96 pocillos se inocularon con diluciones por 10 de las muestras de suero por cuadruplicado, seguido de incubación a 37 °C durante 7 días. Las células se monitorizaron a diario según CPE y el título del virus se expresó en forma de DICT₅₀/ml de acuerdo con el procedimiento de Reed y Muench. En todos los días de toma de muestras, los títulos del virus de exposición eran significativamente menores en los grupos vacunados 4 y 5. El nivel de protección en los grupos 4 y 5 no fue diferente.



Ejemplo 2

- 5 La eficacia del uso simultáneo de una bacterina de *M. hyopneumoniae* (Porcilis® M Hyo) y una vacuna con virus vivos modificados de PRRS (Porcilis ® PRRS) contra *M. hyopneumoniae* también se analizó en lechones comerciales:

grupo	N	1ª vacunación a 1 semana de edad	2ª vacunación a las 4 semanas de edad	Exposición
1	12	M. hyo	M. hyo + PRRS	<i>M. hyopneumoniae</i> a las 6 semanas de edad
2	12	-	PRRS	
3	12	M. hyo	M.hyo	
4	12	-	-	

- 10 La vacuna contra *M. hyopneumoniae* se administró como una dosis intramuscular de 2 ml y la cepa de la vacuna contra PRRS liofilizada también se administró como una dosis intramuscular de 2 ml tras la reconstitución en diluyente (grupo 2) o en la vacuna contra *M. hyopneumoniae* (grupo 1). Durante el experimento, un lechón del grupo 2 se sacrificó antes de la vacunación por una mala salud general y también se tuvo que excluir a varios lechones de los grupos 2, 3 y 4 de la puntuación de las lesiones por pleuritis grave.
- 15 La exposición a *M. hyopneumoniae* se realizó mediante inoculación intratraqueal de los lechones con 1085 UCC de un cultivo de pase bajo de aislamiento de campo de *M. hyopneumoniae* dos días seguidos. Tres semanas después de la exposición, se realizó la necropsia de los cerdos y se puntuó las lesiones pulmonares consolidadas de acuerdo con Goodwin & Whittlestone. La reducción de las lesiones pulmonares específicas de *M. hyopneumoniae* fue estadísticamente significativa para ambos grupos 1 y 3. La diferencia entre el grupo 1 y 3 no fue estadísticamente significativa ($p=0,13$, prueba U de Mann-Whitney).
- 20

grupo	n	1ª vacunación a 1 semana de edad	2ª vacunación a las 4 semanas de edad	Puntuación de las lesiones por <i>M. hyopneumoniae</i> *
1	12	M. hyo	M. hyo + PRRS	1,3 ^a
2	9	-	PRRS	11,7 ^b
3	11	M. hyo	M. hyo	2,4 ^a
4	9	-	-	6,6 ^d

*: La puntuación máxima de la lesión es 55; los grupos con diferentes superíndices son significativamente diferentes ($p<0,05$, prueba U de Mann-Whitney)

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una dosis inmunogénica de material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y a una dosis inmunogénica de virus PRRS atenuados vivos para la fabricación de una vacuna para usar en la administración combinada de la vacuna contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y la vacuna V contra el PRRS a cerdos primovacunados con una vacuna frente a *Mycoplasma hyopneumoniae*.
- 10 2. Uso de acuerdo con la reivindicación 1, **que se caracteriza por que** dicho material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* es una bacterina de *Mycoplasma hyopneumoniae*.
3. Uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, **que se caracteriza por que** el virus atenuado del PRRS es de una cepa europea.
- 15 4. Uso de acuerdo con la reivindicaciones 1-3, **que se caracteriza por que** la vacuna para usar en administración combinada comprende el virus atenuado vivo del PRRS y el material inmunogénico de *Mycoplasma hyopneumoniae* en forma mixta.