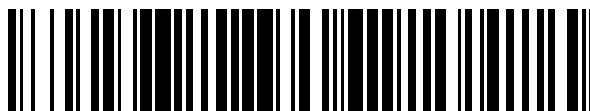


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 598**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2007 E 07865468 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.11.2012 EP 2099479**

54 Título: **Vacuna de salmonella en aves de corral**

30 Prioridad:

11.12.2006 US 869524 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2013

73 Titular/es:

**MERIAL LTD. (100.0%)
3239 SATELLITE BLVD.
DULUTH, GA 30096, US**

72 Inventor/es:

**LE GROS, FRANCOIS-XAVIER y
LEMIERE, STEPHANE**

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

ES 2 398 598 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 de *salmonella* en aves de corral.

- 5 **[0001]** La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de EE.UU. de nº de serie 60/869.524 registrada el 11 de diciembre de 2006.

CAMPO DE LA INVENCION

- 10 **[0002]** La presente invención se refiere al campo de la vacunación contra *Salmonella* en animales, en particular animales aviares. La presente invención comprende también kits y usos de composiciones inmunógenas o vacunas de *Salmonella*.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 **[0003]** *Salmonella spp.* son patógenos intracelulares facultativos que provocan infecciones localizadas o sistémicas, además de un estado de portador asintomático crónico. Tienen importancia económica y para la salud pública en todo el mundo. En aves de corral, la tifosis aviar y la pulorosis siguen provocando pérdidas económicas en aquellas partes del mundo en las cuales las industrias avícolas se están haciendo intensivas y en las que es común el uso de instalaciones abiertas. Diversos serotipos que causan gastroenteritis humana están también en aumento. Los costes o la impracticabilidad de mejoras en la higiene y la gestión junto con problemas crecientes de resistencia a los antibióticos indican que la vacunación en aves de corral se hará más atractiva como una medida auxiliar a las medidas de control ya existentes (Zhang-Barber L. y col., Vaccine, 1999, 17 (20 – 21): 2538 – 45).
- 20

- 25 **[0004]** La *Salmonella* es una de las causas principales de enfermedades transmitidas por el alimento en los seres humanos. Según el informe de la Comisión sobre zoonosis (European Commission: Trends and sources of zoonotic infections in animals, feed, food and man in the European Union and Norway in 2003), se han comunicado 1.335.546 casos humanos de salmonelosis en 2003 en los 15 Estados Miembros de la Unión Europea y Noruega.

- 30 **[0005]** La industria avícola, especialmente en Europa y en los Estados Unidos, se encuentra sometida a una fuerte presión por parte de las autoridades sanitarias y los consumidores para reducir los riesgos de contaminación humana con *Salmonella* de origen aviar, en particular salmonelosis (reducción de patógenos y HACCP en EE.UU., Directiva del Consejo 92/117/EEC en la UE).

- 35 **[0006]** Como la *Salmonella* infecta a numerosas poblaciones de animales (por ejemplo, mamíferos, aves), el riesgo de sufrir salmonelosis siempre existe, con independencia del país, la estación o las prácticas de manipulación de alimentos.

- 40 **[0007]** Las causas zoonóticas de *Salmonella spp.* de infección gastrointestinal humana se han tratado con los agentes antimicrobianos existentes. Desde principios de la década de 1990, han aparecido cepas de *Salmonella* resistentes a una diversidad de agentes antimicrobianos, lo que hace que el tratamiento de la infección sea menos eficiente y aumente el riesgo humano de contraer una infección gastrointestinal causada por *Salmonella spp.*

- 45 **[0008]** Como en años anteriores, dominó la *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis), que causó el 61,8 % (2002: 67,1 %) de todos los casos notificados en la Unión Europea y Noruega. Los índices en los países individuales oscilaron entre el 87,9 % en Austria y el 33,3 % en Francia. La segunda fue la *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium), que causó el 16,5 % de los casos. Los índices en los países individuales oscilaron entre el 5,8 % en Austria y el 28,7 % en Irlanda. Como en años anteriores, después de la *Salmonella* Enteritidis y la *Salmonella* Typhimurium, la mayoría de los casos fueron debidos a *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Virchow (*Salmonella* Virchow), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Infantis (*Salmonella* Infantis) y *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Hadar (*Salmonella* Hadar). Cada una de estas serovariedades está implicada en menos del 1 % de todos los casos notificados.
- 50

- 55 **[0009]** La fuente principal de contaminación es a través del consumo de huevos y carne de ave. La reducción de dichos riesgos se consigue a través de una combinación de medios a lo largo de todas las cadenas de producción de huevos y carne, por ejemplo, con buenas prácticas ganaderas e higiénicas y vacunación.

- 60 **[0010]** La legislación comunitaria sobre higiene alimentaria y control de las zoonosis incluye diversas disposiciones que persiguen controlar y prevenir la contaminación con *Salmonella* de los alimentos. Según se cree, las medidas para reducir la prevalencia de la *Salmonella* en los animales vivos es uno de los modos más eficaces de reducir la contaminación de los alimentos y el número de casos de salmonelosis humana.

[0011] En 2003, se publicó la nueva legislación europea sobre zoonosis; el Reglamento 2160/2003 proporciona la fijación de objetivos de reducción de patógenos a lo largo de la cadena alimentaria, principalmente para poblaciones animales, y el establecimiento de planes nacionales de control con el fin de cumplir con estos objetivos. *Salmonella spp.* es el objetivo principal, en particular los serotipos que se consideran de importancia para la salud pública. Los objetivos se fijarán progresivamente en diferentes poblaciones animales: manadas reproductoras de *Gallus gallus*, gallinas ponedoras, pollos de rápido crecimiento, pavos y cerdos para el sacrificio. Hasta ahora, sólo se han fijado objetivos para manadas reproductoras de *Gallus gallus* (Reglamento 1003/2005); el objetivo se ha establecido en el 1 %, lo que significa que para finales de 2009 el porcentaje máximo de manadas positivas para *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Hadar y *Salmonella* Virchow en el ámbito de la UE será del 1 %.

[0012] En lo que respecta a los criadores, el Reglamento 1091/2005 prohíbe el uso de antimicrobianos como medida de control contra *Salmonella*, mientras que el uso de vacunas es aceptado y recomendado. Las conclusiones y recomendaciones del Panel Científico sobre Riesgos Biológicos en una petición de la Comisión relacionada con el uso de vacunas para el control de *Salmonella* en aves de corral (The EFSA Journal (2004) 114, 1 – 74) son ampliamente favorables hacia el uso de vacunas para controlar *Salmonella* en las explotaciones ganaderas. En particular, las conclusiones del panel son, entre otras, las siguientes:

- La base para el control exitoso de infecciones por *Salmonella* en explotaciones avícolas son las buenas prácticas ganaderas e higiénicas (incluidos todos los aspectos que cubren la alimentación, las aves, la gestión, la limpieza y la desinfección, el control de roedores, etc.) así como las pruebas y la eliminación de manadas positivas de la producción. La vacunación de los pollos se contempla como una medida para aumentar la resistencia de las aves contra la exposición a *Salmonella* y para reducir la presencia en la eliminación fecal.

- Existe evidencia experimental y cierta evidencia de trabajo de campo de que una reducción en el nivel de excreción fecal e invasión sistémica de organismos de *Salmonella* en aves vacunadas dará como resultado una menor contaminación de los huevos de consumo y el entorno.

- Si se establece un programa de control para criadores de aves para puesta / pollos de crecimiento rápido o gallinas ponedoras y la prevalencia en el grupo es elevada, la vacunación puede ser útil para reducir la contaminación de los huevos y la eliminación fecal. Si la prevalencia en el grupo es baja, la vacunación puede no resultar útil aun cuando todavía puede usarse como una de las medidas preventivas para mantener una baja prevalencia.

[0013] Existen más de 2.000 serovariedades de bacterias de *Salmonella*.

[0014] La clasificación de Kauffman y White (http://en.wikipedia.org/wiki/Kauffman-White_classification) permite diferenciar entre sí las distintas variedades serológicas del género *Salmonella*. Esta clasificación diferencia los aislados según la determinación de los antígenos de superficie que son producidos por la bacteria. En primer lugar, se determina el tipo de antígeno "O". Los antígenos "O" son los polisacáridos asociados con el lipopolisacárido de la membrana exterior bacteriana. Una vez que se ha determinado el grupo de antígeno "O", se determina el antígeno "H". Los antígenos "H" son proteínas asociadas con los flagelos bacterianos. Las *Salmonellas* existen en dos fases; una fase móvil y una fase no móvil. Estas se refieren también como fases específica y no específica. Se producen diferentes antígenos "H" dependiendo de la fase en la que se encuentra la *Salmonella*. Las cepas patógenas de *Salmonella typhi* llevan un antígeno adicional, "Vi", así denominado debido a la virulencia potenciada de las cepas que producen este antígeno, que está asociado con una cápsula bacteriana.

[0015] Según la clasificación de Kauffman y White, se forman grupos "O" de serovariedades de *Salmonella*.

[0016] Contra la colonización por la *Salmonella* del grupo C en pollos, se desarrolló una vacuna atenuada, basada en *Salmonella* Hadar de cya eliminado / crp eliminado y una *Salmonella* Hadar de phoP eliminado (Roland K. y col., Avian Dis., 2004, 48 (3): 445 – 52). Aunque el derivado de cya eliminado / crp eliminado indujo niveles superiores de anticuerpo en suero, no proporcionó una respuesta inmunitaria de protección contra la colonización por *Salmonella* Hadar.

[0017] Chacana y col. (Chacana P.A. y col., Avian Dis., 2006, 50 (2): 280-3) demostraron que la vacuna atenuada de *Salmonella* puede desencadenar inmunidad cruzada contra miembros del mismo serogrupo de la clasificación de Kauffman-White. Se exploró la protección conferida por TAD *Salmonella* vac E, una vacuna de *Salmonella* Enteritidis atenuada, contra tífosis aviar. Se vacunó a tres grupos de gallinas ponedoras con diferentes planes de vacunación que comenzaron en el primer día de vida, y posteriormente se les inyectaron 2×10^5 UFC de una cepa virulenta de *Salmonella* Gallinarum, en la semana 28 o en la semana 52. Se valoró la mortalidad, la eliminación por vía fecal y la invasión en órganos de *Salmonella* Gallinarum. La vacuna contra *Salmonella* Enteritidis consiguió la inmunización cruzada contra *Salmonella* Gallinarum, las dos cepas de la *Salmonella* del grupo D, según la clasificación de Kauffman-White. En la semana 28, las gallinas vacunadas con tres dosis orales o con dos dosis orales combinadas con una dosis subcutánea estaban protegidas por la vacuna. Sin embargo, en la semana 52, cuando las gallinas fueron infectadas 36 semanas después de la inmunización final, la vacuna no pudo conferir protección.

Nassar y col. (Rev sci tech Off int Epiz, 1994) desvelan el uso de vacuna con organismos vivos e inactivada de fago tipo 4 de *Salmonella enteritidis* para inmunizar a gallinas ponedoras contra la infección experimental.

5 **[0018]** Debido al gran número de serovariedades de *Salmonella*, existe la necesidad de vacunas contra la *Salmonella* que sean capaces de inducir una respuesta inmunitaria de protección contra más de una serovariedad de *Salmonella* y/o contra *Salmonella* de más de un grupo de clasificación de Kauffman-White.

RESUMEN DE LA INVENCION

10 **[0019]** En consecuencia, la presente invención se refiere a una estrategia de vacunación, que se basa en al menos una primo-administración de una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* atenuada y al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* inactivada. Esta estrategia de vacunación es útil para prevenir la presencia como portadores de *Salmonella* homóloga y heteróloga en sujetos vacunados.

15 **[0020]** La presente invención proporciona, en un aspecto, una composición de vacuna para su uso en la protección cruzada de animales aviares contra una enfermedad causada por al menos una *Salmonella* heteróloga y/o la prevención del transporte de al menos una *Salmonella* heteróloga en animales aviares, en la que la vacuna está formulada para su administración en la forma de un régimen de sensibilización-refuerzo que comprende al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D, administrada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D, en la que la primo-administración y la administración de refuerzo se administran con un intervalo de entre 2 y 18 semanas.

20 **[0021]** En otro aspecto, la presente invención proporciona un kit o conjunto de vacunación para vacunación de animales aviares, que comprende al menos dos viales y un prospecto incluido en el envase con instrucciones de administración, en el que los al menos dos viales comprenden una *Salmonella* atenuada y una *Salmonella* inactivada, en el que el kit o conjunto de vacunación están ensamblados de forma operativa para realizar la administración de la vacuna a un animal de la familia aviar y para desencadenar una respuesta inmunitaria segura y protectora contra *Salmonella*, en el que el primer vial comprende una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* atenuada del grupo D y el segundo vial comprende una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* inactivada del grupo B y de *Salmonella* inactivada del grupo D.

25 **[0022]** En un aspecto adicional, la presente invención proporciona el uso de una composición de vacuna para la fabricación de un medicamento para la protección cruzada de animales aviares contra una enfermedad causada por al menos una *Salmonella* heteróloga y/o la prevención del transporte de al menos una *Salmonella* heteróloga en animales aviares, en la que la vacuna está formulada para su administración en forma de un régimen de sensibilización-refuerzo que comprende al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D, administrada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D, en la que la primo-administración y la administración de refuerzo se administran con un intervalo de entre 2 y 18 semanas.

30 **[0023]** También es un objeto de esta descripción proporcionar procedimientos de uso de composiciones inmunógenas o vacunas con el fin de prevenir la *Salmonella* homóloga y/o heteróloga en animales aviares, en los que se administra al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* atenuada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* inactivada unas semanas más tarde, en particular de 2 semanas a 18 semanas después de la única o primera primo-administración.

35 **[0024]** También es un objeto de esta descripción proporcionar procedimientos de uso de composiciones inmunógenas o vacunas con el fin de prevenir el transporte de *Salmonella* homóloga y/o heteróloga en animales aviares, en los que se administra al menos una primo-administración de una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* atenuada del grupo D a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* inactivada del grupo B y de *Salmonella* inactivada del grupo D unas semanas más tarde, en particular de 2 semanas a 18 semanas después de la única o primera primo-administración. En la presente memoria descriptiva se proporcionan ejemplos de los grupos B y D de *Salmonella*.

[0025] También es un objeto de esta descripción proporcionar kits para vacunación de animales aviares, que comprenden al menos dos viales y un prospecto incluido en el envase con instrucciones de administración, conteniendo el primer vial una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* atenuada y conteniendo el segundo vial una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* inactivada. Opcionalmente, pueden incluirse viales adicionales, viales que comprenden una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* atenuada para primo-administración múltiple y/o viales que comprenden una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* inactivada para administración de refuerzo múltiple.

[0026] Se observa que en esta descripción y en particular en las reivindicaciones términos como "comprende", "comprendido", "que comprende" y similares pueden tener el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de EE.UU.; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye", y similares; y que términos como "que consiste esencialmente en" y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la Ley de Patentes de EE.UU., por ejemplo, admiten elementos no enumerados explícitamente, pero excluyen elementos que se encuentran en la técnica anterior o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

[0027] Estas y otras formas de realización se desvelan o son evidentes a partir de, y están comprendidas por, la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0028] La siguiente descripción detallada, ofrecida a modo de ejemplo, y que no pretende limitar la invención a formas de realización específicas descritas, puede entenderse en conjunción con las figuras adjuntas, incorporadas como referencia en la presente memoria descriptiva, en las que:

La fig. 1 ilustra el porcentaje de reislamiento de cepas de *Salmonella* de pruebas de provocación en el bazo de pollos, 4 a 7 días después de la prueba de provocación.

La fig. 2 ilustra las numeraciones medias en el ciego de cepas de *Salmonella* de pruebas de provocación en pollos, 4 a 7 días después de la prueba de provocación, y las desviaciones típicas.

[0029] En la fig. 1 y la fig. 2, "Control" es el grupo de control no vacunado, que corresponde a G.00; "A+I" es el grupo vacunado dos veces, primero con la vacuna a base de *Salmonella* atenuada y en segundo lugar con la vacuna a base de *Salmonella* inactivada, que corresponde a G.01; "Inactivada" corresponde el grupo vacunado sólo con la vacuna a base de *Salmonella* inactivada, que corresponde a G.02.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0030] La presente descripción se refiere a procedimientos de uso de composiciones inmunógenas o vacunas en animales aviares con el fin de aumentar la respuesta inmunitaria contra al menos una *Salmonella* heteróloga, en los que se administra al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada de una serovariedad de *Salmonella*, a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, y al menos una *Salmonella* inactivada de una serovariedad de *Salmonella*, con un intervalo de unas semanas, en particular un intervalo de 2 semanas a 18 semanas. La *Salmonella* atenuada y la *Salmonella* inactivada pueden proceder de la misma serovariedad o de serovariedades diferentes. Una *Salmonella* heteróloga es una bacteria diferente de las usadas en las composiciones inmunógenas o vacunas administradas durante la primo-administración y durante la administración de refuerzo, por ejemplo, *Salmonella* de otra serovariedad o de otro grupo de *Salmonella* según la clasificación de Kauffman-White.

[0031] Los procedimientos de la descripción objeto pueden usarse en animales aviares con el fin de lograr la protección cruzada de animales aviares contra una enfermedad causada por al menos una *Salmonella* heteróloga y/o la prevención del transporte de al menos una *Salmonella* heteróloga en animales aviares.

[0032] Los procedimientos de la presente descripción pueden usarse también en animales aviares con el fin de reducir el número de bacterias del grupo C de *Salmonella* en el bazo y/o en el ciego de animales aviares infectados, en particular la reducción del número de bacterias del grupo C1 de *Salmonella* y del grupo C2 de *Salmonella* en el bazo y/o en el ciego de animales aviares infectados o la reducción del número de bacterias del grupo B de *Salmonella* y de bacterias del grupo C de *Salmonella* en el bazo y en el ciego de animales aviares infectados. En la presente memoria descriptiva se proporcionan ejemplos de grupos C de *Salmonella*.

[0033] El término "composición inmunógena" se refiere a cualquier composición capaz, una vez que se ha inyectado en un animal aviar, de inducir o estimular una respuesta inmunitaria contra la *Salmonella*.

[0034] El término "composición de vacuna" o "vacuna" se refiere a cualquier composición capaz, una vez que se ha inyectado en un animal, especialmente un animal aviar, de inducir o estimular una respuesta inmunitaria de protección contra enfermedades causadas por *Salmonella* y/o de inducir o estimular una respuesta inmunitaria de protección para prevenir o reducir el transporte de *Salmonella* en animales, especialmente animales aviares.

[0035] Un régimen de sensibilización-refuerzo comprende al menos una primo-administración y al menos una administración de refuerzo que usan al menos un polipéptido, antígeno, epítipo o inmunógeno común. La vacuna usada en primo-administración puede ser de naturaleza diferente a la usada como una vacuna de refuerzo posterior. La primo-administración puede comprender una o más administraciones. Análogamente, la administración de refuerzo puede comprender una o más administraciones.

[0036] Los procedimientos de la descripción incluyen al menos una primo-administración y al menos una administración de refuerzo a un animal, preferentemente aviar, de una cantidad eficaz de la composición inmunógena o vacuna según la descripción. El animal puede ser macho o hembra. Esta administración puede realizarse en particular mediante inyección intramuscular (IM), intradérmica (ID) o subcutánea (SC) o a través de administración intranasal u oral, en las que la administración oral incluye, pero no se limita a, administración en el pienso o en agua potable, geles o aerosoles.

[0037] Los excipientes, diluyentes o vehículos aceptables desde el punto de vista farmacéutico o veterinario pueden ser agua, agua para inyección, suero salino o tampón. A la composición inmunógena o vacuna atenuada puede añadirse un estabilizador, como glicerina, solución de glúcidos, como solución de sacarosa.

[0038] La composición inmunógena o vacuna atenuada usada en la primo-administración según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada. La *Salmonella* atenuada puede seleccionarse entre el grupo que consiste en el grupo D de *Salmonella* y el grupo B de *Salmonella*, preferentemente entre el grupo D que consiste en *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum, y entre el grupo B que consiste en *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Saint-Paul, *Salmonella* Brandenburg. En una forma de realización preferida, la composición inmunógena o vacuna atenuada usada en la primo-administración según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D. En otra forma de realización preferida, la composición inmunógena o vacuna atenuada usada en la primo-administración según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo B. En otra forma de realización preferida, la composición inmunógena o vacuna atenuada usada en la primo-administración según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo B. En una forma de realización de la máxima preferencia, la composición inmunógena o vacuna atenuada usada en la primo-administración según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y *Salmonella* Enteritidis atenuada. En otra forma de realización de la máxima preferencia, la composición inmunógena o vacuna atenuada usada en la primo-administración según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, y *Salmonella* Enteritidis atenuada y *Salmonella* Typhimurium atenuada.

[0039] Entre los ejemplos de varios grupos de clasificación de *Salmonella* según Kauffman-White se incluyen los grupos A, B, C1-3, D, E1-4, F, G, H e I, de los cuales se proporcionan ejemplos a continuación.

[0040] Por ejemplo, el grupo A comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Paratyphi A (*Salmonella* Paratyphi A), *Salmonella* Paratyphi A variante durazzo.

[0041] Por ejemplo, el grupo B comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Paratyphi B (*Salmonella* Paratyphi B), *Salmonella* Paratyphi B variante odense, *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Java (*Salmonella* Java), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Braenderup (*Salmonella* Braenderup), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Agona (*Salmonella* Agona), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Bredeney (*Salmonella* Bredeney), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Heidelberg (*Salmonella* Heidelberg), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Indiana (*Salmonella* Indiana), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Saint-Paul (*Salmonella* Saint-Paul), *Salmonella enterica subspecies entetica* serovariedad Brandenburg (*Salmonella* Brandenburg), *Salmonella enterica*

subspecies enterica serovariedad Limete (*Salmonella* Limete), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Agama (*Salmonella* Agama), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Derby (*Salmonella* Derby), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Salinatis (*Salmonella* Salinatis), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Stanley (*Salmonella* Stanley).

5
[0042] Por ejemplo, el grupo C1 comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Paratyphi C (*Salmonella* Paratyphi C), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Infantis (*Salmonella* Infantis), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Mbandaka (*Salmonella* Mbandaka), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Livingstone (*Salmonella* Livingstone), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Virchow (*Salmonella* Virchow), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Ohio (*Salmonella* Ohio), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Montevideo (*Salmonella* Montevideo), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Tennessee (*Salmonella* Tennessee), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Rissen (*Salmonella* Rissen), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Decatur (*Salmonella* Decatur), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Bareilly (*Salmonella* Bareilly), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Menston (*Salmonella* Menston), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Oranienburg (*Salmonella* Oranienburg), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Thompson (*Salmonella* Thompson).

10
[0043] Por ejemplo, el grupo C2 comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Hadar (*Salmonella* Hadar), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Newport (*Salmonella* Newport), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Kottbus (*Salmonella* Kottbus).

15
[0044] Por ejemplo, el grupo C3 comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Kentucky (*Salmonella* Kentucky), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Albany (*Salmonella* Albany).

20
[0045] Por ejemplo, el grupo D comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Typhi (*Salmonella* Typhi), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Enteritidis (*Salmonella* Enteritidis), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Panama (*Salmonella* Panama), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Dublin (*Salmonella* Dublin), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Pullorum (*Salmonella* Pullorum), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Ndolo (*Salmonella* Ndolo), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Miami (*Salmonella* Miami), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Sendai (*Salmonella* Sendai).

25
[0046] Por ejemplo, el grupo E1 comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Give (*Salmonella* Give), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Anatum (*Salmonella* Anatum), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad London (*Salmonella* London), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Meleagridis (*Salmonella* Meleagridis).

30
[0047] Por ejemplo, el grupo E2 comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Cambridge (*Salmonella* Cambridge), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Newington (*Salmonella* Newington).

35
[0048] Por ejemplo, el grupo E3 comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Minneapolis (*Salmonella* Minneapolis).

40
[0049] Por ejemplo, el grupo E4 comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Simsbury (*Salmonella* Simsbury), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Senftenberg (*Salmonella* Senftenberg).

45
[0050] Por ejemplo, el grupo F comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Aberdeen (*Salmonella* Aberdeen).

50
[0051] Por ejemplo, el grupo G comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Cubana (*Salmonella* Cubana), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Poona (*Salmonella* Poona).

55
[0052] Por ejemplo, el grupo H comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Heves (*Salmonella* Heves), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Onderstepoort (*Salmonella* Onderstepoort).

60
[0053] Por ejemplo, el grupo 1 comprende *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Brazil (*Salmonella* Brazil), *Salmonella enterica subspecies enterica* serovariedad Hvitvingfoss (*Salmonella* Hvitvingfoss).

[0054] Algunas vacunas a base de *Salmonella* atenuada y algunas vacunas a base de *Salmonella* inactivada están disponibles comercialmente.

[0055] Las patentes de EE.UU. nº 7.045.122; 6.923.957; 6.905.691; 6.605.285; 5.843.426; 5.733.760; 5.424.065; 5.389.368; y 6.592.869 se refieren a vacunas contra *Salmonella*, incluidas las vacunas atenuadas e inactivadas.

[0056] Las especies de *Salmonella* pueden ser atenuadas racionalmente mediante la introducción de mutaciones definidas de no reversión en el genoma para producir cepas de vacunas de organismos vivos. Se han identificado varios genes, que cuando mutan, atenuarán las *Salmonellae*. En particular, las cepas de *Salmonella* que contienen mutaciones de no reversión en genes implicados en la ruta biosintética pre-corismato forman excelentes vacunas orales que evocan intensas respuestas inmunitarias humorales, locales y celulares en el hospedador (Chatfield S.N. y col., Vaccine, 1989, 7 (6): 495 – 8; Chatfield S.N. y col., FEMS Immunol. Med. Microbiol., 1993, 7 (1): 1 – 7), en genes aro de la ruta biosintética aromática (documento EP-B1-0.322.237), en los mutantes RfaH de regulador transcripcional de *Salmonella* Typhimurium, que son eficaces como vacunas orales atenuadas contra salmonelosis en ratones (Nagy G. y col., Infect. Immun., 2006, 74 (10): 5914 – 25).

[0057] La *Salmonella* puede ser atenuada por modificación de la estructura del genoma de las bacterias, por ejemplo, por delección de parte de un gen de *Salmonella*, por inserción de secuencia de nucleótidos heteróloga en un gen de *Salmonella*, y/o por sustitución de parte de un gen de *Salmonella* por secuencia de nucleótidos heteróloga. Es posible atenuar la *Salmonella* mediante la introducción de mutaciones que (i) confieren auxotrofia, (ii) interfieren con el metabolismo de los azúcares y la biosíntesis de lipopolisacáridos o (iii) afectan a algunos medios globales de regulación de los genes necesarios para una exposición completa de la virulencia.

[0058] Por ejemplo, la *Salmonella* atenuada pueden ser bacterias que comprenden al menos una mutación de una alteración metabólica de la resistencia a la estreptomycinina y a la rifampicina para la atenuación (documento EP-B1-0.642.796), como, por ejemplo, la cepa atenuada de *Salmonella* Enteritidis Sm 24/Rif 12/Ssq (documento EP-B1-0.642.796); *Salmonella* Enteritidis atenuada por una primera mutación en la región reguladora *phoP* que provoca expresión constitutiva de un gen bajo el control de dicha región y por una segunda mutación en un gen *pag* o *prg* (documento EP-B1-0.563.311); *Salmonella* Enteritidis atenuada por una mutación de no reversión en el gen *htrA* (documento US-A-5.804.194); *Salmonella* atenuada que muestra auxotrofia para uno o más factores de crecimiento seleccionados entre el grupo que consiste en fenilalanina, tirosina, triptófano y ácido para-aminobenzoico, de manera que es incapaz de crecimiento en un medio mínimo en ausencia de dichos uno o más factores de crecimiento (documento US-A-6.231.871), como, por ejemplo, *Salmonella* Typhimurium cepa STM-1, depositada en Australian Government Analytical Laboratories según el número de referencia N93143266 (documento US-A-6.231.871); mutantes auxótrofos de *Salmonella* Enteritidis obtenidos a través de mutagenia de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, como la cepa E 3/49, la cepa 1/37, la cepa C7/1, la cepa C7/2, la cepa C7/18, la cepa C7/19, la cepa E1/23, la cepa E1/25, la cepa E2/7, la cepa E3/44 y la cepa E3/51 (Martin G. y col., Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 1996, 109 (10): 325 – 9); *Salmonella* Typhimurium atenuada que contiene una mutación de no reversión en cada uno de dos genes aro discretos de la ruta biosintética aromática, como aroA y aroC, aroA y aroD, aroA y aroE (documento EP-B1-0.322.237); derivado de aroC definido genéticamente de *Salmonella* Enteritidis atenuada (cepa LVR02, véase Betancor L. y col., Vet. Microbiol., 2005, 107 (1 – 2): 81 – 9); y *Salmonella* Typhimurium atenuada que tiene una mutación que inactiva un gen seleccionado entre: hupA, dksA, rfaY, sipC o clpB (documento WO-A1-98/02.523).

[0059] Las mutaciones de atenuación pueden obtenerse también por inserción de un transposón. Por ejemplo, el transposón en el mutante EZ870 se introduce en una secuencia de nucleótidos de *Salmonella* Enteritidis que es homóloga (98,4 % de pares de bases idénticos en una superposición de 188 pb) al gen *spiC* de *Salmonella* Typhimurium (Número de referencia U51927, Ochman H., Soncini F.C. Solomon F. y Groisman E.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93, 7800 – 7804, 1996). La *Salmonella* enteritidis EZ870 modificada genéticamente tiene el número de depósito LMGP-18484 en la BCCM/LMG Culture Collection, Laboratorium voor Microbiologie, Ledeganckstraat 35, B-9000 Gante, Bélgica (documento WO-A-99/37.759).

[0060] La composición inmunógena o vacuna inactivada usada en la administración de refuerzo según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* inactivada. La *Salmonella* inactivada puede seleccionarse entre el grupo que consiste en grupo E de *Salmonella*, grupo D de *Salmonella*, grupo C de *Salmonella* y grupo B de *Salmonella*, preferentemente entre el grupo que consiste en grupo E1 de *Salmonella*, grupo E4 de *Salmonella*, grupo D de *Salmonella*, grupo C1 de *Salmonella*, grupo C2 de *Salmonella*, grupo C3 de *Salmonella* y grupo B de *Salmonella*, y más preferentemente entre el grupo E1 que consiste en *Salmonella* Anatum, entre el grupo E4 que consiste en *Salmonella* Senftenberg, entre el grupo D que consiste en *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum, entre el grupo C1 que consiste en *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Tennessee, *Salmonella* Rissen, entre el grupo C2 que consiste en *Salmonella*

Hadar, *Salmonella* Newport, *Salmonella* Kottbus, entre el grupo C3 que consiste en *Salmonella* Kentucky, *Salmonella* Albany, y entre el grupo B que consiste en *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Saint-Paul, *Salmonella* Brandenburg.

[0061] En una forma de realización preferida, la composición inmunógena o vacuna inactivada usada en la administración de refuerzo según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D. En otra forma de realización preferida, la composición inmunógena o vacuna inactivada usada en la administración de refuerzo según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo C y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D. En una forma de realización de máxima preferencia, la composición inmunógena o vacuna inactivada usada en la administración de refuerzo según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y *Salmonella* Typhimurium inactivada y *Salmonella* Enteritidis inactivada. En otra forma de realización de máxima preferencia, la composición inmunógena o vacuna inactivada usada en la administración de refuerzo según los procedimientos de uso de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y *Salmonella* Typhimurium inactivada y *Salmonella* Enteritidis inactivada y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo C2. En otra forma de realización de máxima preferencia, la composición inmunógena o vacuna inactivada usada en la administración de refuerzo según los procedimientos de la presente descripción comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y *Salmonella* Typhimurium inactivada y *Salmonella* Enteritidis inactivada y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo C2 y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo C1.

[0062] La *Salmonella* puede ser inactivada químicamente por tratamiento con agentes de inactivación, como formaldehído, etilenimina, derivados de amida de etilenimina (por ejemplo, acetiletilenimina), propilenimina, β -propiolactona, timerosal, acetona o inactivación por calor. En una forma de realización preferida, el agente de inactivación es formaldehído.

[0063] En determinados aspectos, los procedimientos preferidos de uso de composiciones inmunógenas o vacunas en animales aviares según la descripción comprenden al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D, administrada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D, con un intervalo de unas semanas, por ejemplo, un intervalo de 2 semanas a 18 semanas. En una forma de realización en particular de este procedimiento preferido, las bacterias de *Salmonella* del grupo D atenuadas son *Salmonella* Enteritidis, las bacterias de *Salmonella* del grupo B inactivadas son *Salmonella* Typhimurium y las bacterias de *Salmonella* del grupo D inactivadas son *Salmonella* Enteritidis.

[0064] Otros procedimientos preferidos de uso de composiciones inmunógenas o vacunas en animales aviares según la descripción comprenden al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D, administrada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo C2 y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D, con un intervalo de unas semanas, en particular un intervalo de 2 semanas a 18 semanas. En una forma de realización en particular de este procedimiento preferido, las bacterias de *Salmonella* del grupo D atenuadas son *Salmonella* Enteritidis, las bacterias de *Salmonella* del grupo B inactivadas son *Salmonella* Typhimurium, las bacterias *Salmonella* del grupo D inactivadas son *Salmonella* Enteritidis y las bacterias de *Salmonella* del grupo C2 inactivadas son *Salmonella* Hadar.

[0065] Otros procedimientos preferidos de uso de composiciones inmunógenas o vacunas en animales aviares según la descripción comprenden al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D, administrada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo C1, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo C2 y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D, con un intervalo de unas semanas, por ejemplo, un intervalo de 2 semanas a 18 semanas. En una forma de realización en particular de este procedimiento preferido, las

bacterias de *Salmonella* del grupo D atenuadas son *Salmonella* Enteritidis, las bacterias de *Salmonella* del grupo B inactivadas son *Salmonella* Typhimurium, las bacterias de *Salmonella* del grupo D inactivadas son *Salmonella* Enteritidis, las bacterias de *Salmonella* del grupo C2 inactivadas son *Salmonella* Hadar y las bacterias *Salmonella* del grupo C1 inactivadas son *Salmonella* Virchow y/o *Salmonella* Infantis.

5
 [0066] Otros procedimientos preferidos de uso de composiciones inmunógenas o vacunas en animales aviares según la descripción comprenden al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo B,
 10 administrada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D, con un intervalo de unas semanas, por ejemplo, un intervalo de 2 semanas a 18 semanas. En una forma de realización en particular de este procedimiento preferido, las bacterias de *Salmonella* del grupo D atenuadas son *Salmonella* Enteritidis, las bacterias de *Salmonella* del grupo B atenuadas son *Salmonella* Typhimurium, las bacterias de *Salmonella* del grupo B inactivadas son *Salmonella* Typhimurium y las bacterias de *Salmonella* del grupo D inactivadas son *Salmonella* Enteritidis.

20 [0067] Otros procedimientos preferidos de uso de composiciones inmunógenas o vacunas en animales aviares según la descripción comprenden al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo B, administrada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista
 25 farmacéutico o veterinario, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo C2 y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D, con un intervalo de unas semanas, en particular un intervalo de 2 semanas a 18 semanas. En una forma de realización en particular de este procedimiento preferido, las bacterias de *Salmonella* del grupo D atenuadas son *Salmonella* Enteritidis, las bacterias de *Salmonella* del grupo B atenuadas son *Salmonella* Typhimurium, las bacterias de *Salmonella* del grupo B inactivadas son *Salmonella* Typhimurium, las bacterias de *Salmonella* del grupo D inactivadas son *Salmonella* Enteritidis y las bacterias de *Salmonella* del grupo C2 inactivadas son *Salmonella* Hadar.

35 [0068] Otros procedimientos preferidos de uso de composiciones inmunógenas o vacunas en animales aviares según la descripción comprenden al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo B, administrada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista
 40 farmacéutico o veterinario, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo C1, al menos una *Salmonella* inactivada del grupo C2 y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D, con un intervalo de unas semanas, por ejemplo, un intervalo de 2 semanas a 18 semanas. En una forma de realización en particular de este procedimiento preferido, las bacterias de *Salmonella* del grupo D atenuadas son *Salmonella* Enteritidis, las bacterias de *Salmonella* del grupo B atenuadas son *Salmonella* Typhimurium, las bacterias de *Salmonella* del grupo B inactivadas son *Salmonella* Typhimurium, las bacterias de *Salmonella* del grupo D inactivadas son *Salmonella* Enteritidis, las bacterias de *Salmonella* del grupo C2 inactivadas son *Salmonella* Hadar y las bacterias de *Salmonella* del grupo C1 inactivadas son *Salmonella* Virchow y/o *Salmonella* Infantis.

50 [0069] Puede añadirse adyuvante o adyuvantes a la suspensión bacteriana, obtenida en particular después de cultivo e inactivación. Un adyuvante puede escogerse entre hidróxido de aluminio, saponina, cualquier emulsión de agua en aceite o emulsión de aceite en agua que sea compatible con tejidos aviares (véase, por ejemplo, Herbert W.J., The Lancet, 1965, octubre 16: 771; Brugh M. y col., Am. J. Vet. Res., 1983, 44 (1): 72 – 5; Boersma W.J.A. y col., 44th Forum in Immunology, "Characteristics and use of new-generation adjuvants", 503 – 511; Gast y col., Avian Diseases, 1993, 37 (4): 1085 – 91; Stone, Avian Diseases, 1993, 37: 399 – 405; Stone y col., Avian Diseases, 1990, 34: 979 – 983; Stone y col., Avian Diseases, 1983, 27 (3): 688 – 697; documento US-A-3.919.411; documento WO-A-05/00.946)

60 [0070] Entre los ejemplos de adyuvantes se incluyen, pero no se limitan a, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite en agua basadas en aceite mineral y/o aceite vegetal y tensioactivos no iónicos como copolímeros de bloque, Tween®, Span®. Dichas emulsiones son en particular las descritas en la página 147 de "Vaccine Design – The Subunit and Adjuvant Approach", Pharmaceutical Biotechnology, 1995, volumen 6, editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, Plenum Press, Nueva York y Londres, o emulsiones TS, en particular la emulsión TS6, y emulsiones LF, en particular la emulsión LF2 (sobre emulsiones TS y LF, véase el documento WO-A-04/024.027). Otros adyuvantes adecuados son, por ejemplo, vitamina E, saponinas y polímeros de ácido acrílico o metacrílico reticulado, es decir Carbopol® (Noveon; véanse los documentos WO-A-99/51.269; WO-A-99/44.633), Havlogen®,

hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio ("Vaccine Design, The subunit and adjuvant approach", Pharmaceutical Biotechnology, vol. 6, editado por Michael F. Powell y Mark J. Newman, 1995, Plenum Press Nueva York), adyuvantes biológicos (por ejemplo, C4b, en particular C4b murino (Ogata R T y col., J. Biol. Chem. 1989, 264 (28): 16565 – 16572) o C4b equino, GM-CSF, en particular GM-CSF equino (documento US-A-6.645.740)), toxinas (por ejemplo, toxinas del cólera CTA o CTB, toxinas termolábiles *Escherichia coli* LTA o LTB (Olsen C W y col., Vaccine, 1997, 15 (10): 1149 – 1156; Fingerut E y col., Vaccine, 2005, 23 (38): 4685 – 4696; Zurbniggen R y col., Expert Rev Vaccines, 2003, 2 (2): 295 – 304; Peppoloni S y col., Expert Rev Vaccines, 2003, 2 (2): 285 – 293)) y CpG (por ejemplo, CpG #2395 (véase Jurk M y col., Immunobiology 2004, 209 (1 – 2): 141 – 154), CpG #2142 (véase SEQ. ID. NO: 890 en el documento EP-B1-1.221.955), CpG #2135, CpG #2007, CpG #2336). Los polímeros de ácido acrílico o metacrílico reticulado, especialmente los reticulados por éteres de polialqueno de azúcares o polialcoholes son conocidos por el nombre de carbómero (Pharmeuropa, vol. 8, n° 2, junio de 1996). Un experto en la materia también puede referirse a la patente de EE.UU. n° 2.909.462, que proporciona dichos polímeros acrílicos reticulados por un compuesto de polihidroxilo que tiene al menos tres grupos hidroxilo, preferentemente no más de ocho de dichos grupos, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres grupos hidroxilo sustituidos por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos dos átomos de carbono. Los radicales preferidos son los que contienen de 2 a 4 átomos de carbono, por ejemplo, vinilos, alilos y otros grupos etilénicamente insaturados. Los radicales insaturados pueden contener también otros sustituyentes, como metilo. Son especialmente adecuados los productos comercializados con el nombre de Carbopol® (Noveon). Están reticulados por alil-sacarosa o por alil-pentaeritritol. Entre ellos, se hace referencia a Carbopol 974P, 934P, 934, 940 y 971P.

[0071] Las composiciones inmunógenas y vacunas según la descripción pueden ser liofilizadas ventajosamente con un estabilizador. La liofilización puede realizarse según procedimientos de liofilización estándar bien conocidos. Los estabilizadores aceptables desde un punto de vista farmacéutico o veterinario pueden ser hidratos de carbono (por ejemplo, sorbitol, manitol, lactosa, sacarosa, glucosa, dextrano, trehalosa), glutamato de sodio (Tsvetkov T y col., Cryobiology 1983, 20 (3): 318 – 23; Israeli E y col., Cryobiology 1993, 30 (5): 519 – 23), proteínas como peptona, albúmina, lactoalbúmina o caseína, agentes que contienen proteínas como leche desnatada (Mills C K y col., Cryobiology 1988, 25 (2): 148 – 52; Wolff E y col., Cryobiology 1990, 27 (5): 569 – 75) y tampones (por ejemplo, tampón de fosfato, tampón de fosfato de metal alcalino). Pueden usarse adyuvantes para solubilizar las preparaciones liofilizadas.

[0072] Entre los ejemplos de aceites útiles se incluyen, pero no se limitan a, aceite mineral, como aceite de parafina, Drakeol® 6VR, Marcol® 80; Marcol® 52; aceites de terpeno como escualeno y escualano; aceites vegetales como aceite de soja, aceite de oliva, aceite de maíz, aceite de yoyoba, aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de girasol, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de hueso de albaricoque, aceite de aguacate, aceite de germen de trigo, aceite de colza, aceite de linaza y aceite de almendra; aceites de pescado como aceite de tiburón, aceite de reloj anaranjado, aceite de lacha tirana y aceite de hígado de bacalao; aceites animales como aceite de visón, aceite de manteca de cerdo y aceite de grasa de pollo.

[0073] Entre los ejemplos de tensioactivos usados en vacunas en emulsión se incluyen Arlacel® 80 (monooleato de sorbitano), Tween® 80 (Polisorbato 80), Span® 80, Span® 85, Arlacel® 83 (sesquioleato de sorbitano), Arlacel® 85 (sesquioleato de sorbitano) y Tween® 61 (polioxietilensorbitano), por ejemplo. Entre los tensioactivos adecuados para vacunas de agua en aceite animales y vegetales se incluyen cera de abeja purificada y refinada, por ejemplo. Además, entre los tensioactivos adecuados para vacunas que contienen escualeno y escualano se incluyen Arlacel® y Tween® 80.

[0074] Preferentemente, el adyuvante es un aceite para formar una emulsión de agua en aceite que comprende un aceite de parafina y tensioactivos, en particular un aceite de parafina, un éster de ácido graso y polioliol, y un éster de ácido graso y polioliol etoxilado.

[0075] Entre los animales aviares que pueden ser vacunados por un procedimiento de la presente descripción se incluyen pollos, gallinas, pavos, patos, ánades, gansos, ansarinos, gallinas pintadas, faisanes, gallinillas de Bantam, codornices, palomas.

[0076] Los procedimientos de la presente descripción se refieren a al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* atenuada y al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* inactivada. Un animal aviar de un día de vida puede ser vacunado por un procedimiento según la presente descripción, es decir, la única o primera primo-administración puede administrarse en un animal aviar de un día de vida. Preferentemente, la única o primera primo-administración se administra a animales aviares de un día a aproximadamente 28 días de vida, y más preferentemente de un día a aproximadamente 15 días de vida. Cuando se administran al menos dos primo-administraciones, estas primo-administraciones se administran preferentemente con intervalos de 2 a 4 semanas. La administración de refuerzo se administra de 2 a 18 semanas después de la única o primera primo-administración, preferentemente de 3 a 10 semanas después de la única o primera primo-administración, y más preferentemente de 3 a 6 semanas después de la única o primera primo-administración. Cuando se administran al

menos dos administraciones de refuerzo, estas administraciones de refuerzo se administran preferentemente en intervalos de 2 a 12 semanas.

[0077] En una forma de realización preferida, los procedimientos de la presente descripción comprenden dos primo-administraciones y dos administraciones de refuerzo. Las primo-administraciones se administran preferentemente con intervalos de 2 a 4 semanas. La primera administración de refuerzo se administra de 6 a 10 semanas después de la primera primo-administración, y preferentemente de 8 a 10 semanas después de la primera primo-administración. La segunda administración de refuerzo se administra de 14 a 18 semanas después de la primera primo-administración, y preferentemente de 15 a 16 semanas después de la primera primo-administración.

[0078] En otra forma de realización preferida, los procedimientos de la presente descripción comprenden dos primo-administraciones y una administración de refuerzo. Las primo-administraciones se administran preferentemente con intervalos de 2 a 4 semanas. La administración de refuerzo se administra de 6 a 18 semanas después de la primera primo-administración, y preferentemente de 6 a 16 semanas después de la primera primo-administración, y más preferentemente de 11 a 16 semanas después de la primera primo-administración.

[0079] En otra forma de realización preferida, los procedimientos de la presente descripción comprenden una primo-administración y dos administraciones de refuerzo. La primera administración de refuerzo se administra de 2 a 10 semanas después de la primo-administración, y preferentemente de 3 a 6 semanas después de la primo-administración. La segunda administración de refuerzo se administra de 12 a 18 semanas después de la primo-administración, y preferentemente de 14 a 16 semanas después de la primo-administración.

[0080] En otra forma de realización preferida, los procedimientos de la presente descripción comprenden una primo-administración y una administración de refuerzo. La administración de refuerzo se administra de 2 a 18 semanas después de la primo-administración, y preferentemente de 3 a 10 semanas después de la primo-administración, y más preferentemente de 3 a 6 semanas después de la primo-administración.

[0081] Las vías de administración adecuadas de las composiciones inmunógenas o vacunas según los procedimientos de la presente descripción para primo-administración incluyen vías orales, por ejemplo, por ingestión de agua, o vías oculares, por ejemplo, por nebulización.

[0082] Las dosis de composiciones inmunógenas o vacunas atenuadas para primo-administración según los procedimientos de la presente descripción incluyen de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 2,0 ml, preferentemente de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 1,0 ml, y más preferentemente de aproximadamente 0,4 ml a aproximadamente 0,6 ml. Estas dosis tienen de aproximadamente 10^6 unidades formadoras de colonias por dosis (UFC/dosis) a aproximadamente 10^{10} UFC/dosis de cada cepa de *Salmonella*, y preferentemente aproximadamente 10^8 UFC/dosis de cada cepa de *Salmonella*. Cuando se administra una composición inmunógena o vacuna atenuada con agua potable a un animal aviar, estas dosis se diluyen de aproximadamente 1 ml a aproximadamente 5 ml de agua potable por animal aviar.

[0083] Las vías de administración adecuadas de las composiciones inmunógenas o vacunas según los procedimientos de la presente descripción para administración de refuerzo incluyen vías subcutáneas (SC) y vías intramusculares (IM). Una composición inmunógena o vacuna según los procedimientos de la presente descripción puede administrarse mediante una jeringa con una aguja o mediante un aparato sin aguja (como, por ejemplo, Pigjet, Avijet, Dermojet, Vitajet o Biojector (Bioject, Oregón, EE.UU.)), véase el documento US-A-2006/0.034.867).

[0084] Las dosis de composiciones inmunógenas o vacunas inactivadas para la administración de refuerzo según los procedimientos de la presente descripción pueden ser de aproximadamente 0,05 ml a aproximadamente 2,0 ml, preferentemente de aproximadamente 0,1 ml a aproximadamente 1,0 ml, y más preferentemente de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 0,4 ml. Estas dosis tienen de aproximadamente 10^6 UFC/dosis antes de la inactivación a aproximadamente 10^{10} UFC/dosis antes de la inactivación de cada cepa de *Salmonella*, y preferentemente de aproximadamente 10^8 UFC/dosis antes de la inactivación de cada cepa de *Salmonella*.

[0085] Otro aspecto de la descripción es un kit para vacunación de animales aviares según la presente descripción. En una forma de realización, el kit comprende al menos dos viales y un prospecto incluido en el envase con instrucciones de administración, el primer vial comprende una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* atenuada para primo-administración según los procedimientos de la presente descripción y el segundo vial comprende una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* inactivada para administración de refuerzo según los procedimientos de la presente descripción. Opcionalmente, el kit puede comprender viales que comprenden una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* atenuada para primo-administración múltiple y/o viales que comprenden una composición inmunógena o vacuna a base de *Salmonella* inactivada para administración de refuerzo múltiple.

[0086] En otra forma de realización, el kit para vacunación de animales aviares comprende al menos dos viales y un prospecto incluido en el envase con instrucciones de administración, comprendiendo el primer vial una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* atenuada del grupo D y comprendiendo el segundo vial una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* inactivada del grupo B y de *Salmonella* inactivada del grupo D. Opcionalmente, el kit puede comprender viales que comprenden una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* atenuada del grupo D para primo-administración múltiple y/o viales que comprenden una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* inactivada del grupo B y de *Salmonella* inactivada del grupo D para administración de refuerzo múltiple.

10 **[0087]** A continuación se describirá adicionalmente la invención por medio de los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1:

15 **[0088]** Para la producción de la vacuna atenuada, se usó un mutante de doble marcador auxótrofo de adenina / histidina de cepa de *Salmonella* Enteritidis fago tipo 4 (PT4), obtenida a través de mutagenia de N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina. Esta cepa de *Salmonella* se denominó cepa E 3/49 (Martin G. y col., Berl. Münch. Tierärztl. Wschr., 1996, 109 (10): 325 – 9). Se cultivó la cepa de *Salmonella* E 3/49 en medio nutriente que contenía extracto de levadura, triptona, Na₂HPO₄ x 2 H₂O, MgSO₄ x 7 H₂O y agua para inyección, pH 7,6 ± 0,2, durante 18 a 24 horas a 37 °C ± 1 °C como un cultivo no ventilado. Los cultivos se estabilizaron con glicerina al 10 % en volumen, se rellenaron con ello recipientes en partes alícuotas de 1,8 ml y se almacenó a -80 °C ± 5 °C.

20 **[0089]** Se usó el mismo medio nutriente con adición de glucosa para fermentación de la cepa bacteriana. Los cultivos fueron cultivos no ventilados durante 8 a 24 horas o cultivos en matraces con agitación durante 8 a 16 horas a 37 °C ± 1 °C. El inóculo fue del 0,2 al 10 % en volumen.

[0090] Los cultivos se almacenaron a entre + 2 °C y + 8 °C durante hasta 4 días.

30 **[0091]** Se recogieron y diluyeron las bacterias obtenidas con solución salina fisiológica tamponada dependiendo del recuento de organismos y solución de sacarosa al 20 % en volumen (concentración máxima del 60 %). El pH de la vacuna se ajustó a 7,0 ± 0,5 con NaOH o CH₃COOH.

[0092] A continuación se liofilizó la suspensión bacteriana para su almacenamiento.

35 **[0093]** Se enfriaron las bandejas a 0 °C paso a paso desde el fondo hacia arriba. Se congeló la vacuna en el liofilizador a una temperatura mínima de -40 °C durante aproximadamente 3 a 4 horas. Una vez que se obtuvo el vacío necesario se inició el proceso de secado principal (temperatura de la bandeja controlada a un máximo de + 10 °C), hasta que se alcanzó una temperatura del producto de + 5 °C. A continuación se realizó un secado secundario a una temperatura de bandeja de + 35 °C como máximo durante un máximo de 12 horas.

40 **[0094]** Después del secado, se llenaron los frascos con nitrógeno seco estéril, se sellaron automáticamente, se bruñeron y se almacenaron en una sala fresca.

45 **[0095]** En la vacuna atenuada obtenida después de la reconstitución en 0,5 ml de agua potable para animal aviar, la valoración de *Salmonella* Enteritidis atenuada fue de 10⁸ unidades formadoras de colonias (UFC) por dosis.

EJEMPLO 2:

50 **[0096]** Para la producción de la vacuna inactivada, se usaron dos cepas diferentes de *Salmonella*, cepa de *Salmonella* Enteritidis PT 4 y cepa de *Salmonella* Typhimurium DT 104.

[0097] Se puso en cultivo cada una de las cepas de *Salmonella* en caldo de soja tripticasa en agar blando al 0,25 % (TSA).

55 **[0098]** Se recogieron las bacterias obtenidas, se diluyeron en agua para inyección y se congelaron a una temperatura objeto de -70 °C en bolsas en presencia de un crioprotector (20 % de glicerol y 5 % de sacarosa) durante el almacenamiento.

60 **[0099]** Para la inactivación de la cepa de *Salmonella* Enteritidis PT 4, se descongelaron bolsas que contenían cepa de *Salmonella* Enteritidis PT 4, y se transfirió la suspensión bacteriana a un vaso estéril. Se añadió el agente de inactivación, solución de formaldehído al 35 %, en una concentración del 3,88 % (volumen de solución de formaldehído / volumen de cultivo) a la suspensión bacteriana. Después de mezcla por agitación, se transfirió la suspensión a otro vaso estéril. Se llevó a cabo la inactivación bajo agitación durante 24 horas a 24 °C.

[0100] Para la inactivación de la cepa de *Salmonella* Typhimurium DT 104, se llevó a cabo el mismo procedimiento descrito para la cepa de *Salmonella* Enteritidis PT 4.

5 **[0101]** Se almacenaron las bacterias inactivadas a una temperatura de + 5 °C +/- 3 °C hasta su uso para la formulación.

10 **[0102]** Se mezclaron las bacterias de *Salmonella* Enteritidis PT 4 inactivadas y las bacterias de *Salmonella* Typhimurium DT 104 inactivadas y se formularon con un adyuvante de emulsión de agua en aceite que comprende un aceite de parafina, un éster de ácido graso y poliol, y un éster de ácido graso y poliol etoxilado.

[0103] Se añadió un conservante en el producto final (es decir, timerosal) a una concentración final de 100 µg por ml.

15 **[0104]** En la vacuna inactivada, la valoración de la cepa de *Salmonella* Enteritidis PT 4 fue de 10^{8,3} UFC/dosis antes de la inactivación, y la de la cepa de *Salmonella* Typhimurium DT 104 fue de 10⁸ UFC/dosis antes de la inactivación.

EJEMPLO 3:

20 **[0105]** En el D0 del estudio se tomaron aleatoriamente 30 pollos LPE (libres de patógeno específico) de un día de vida, y a continuación se asignaron a tres grupos de 10 pollos cada uno.

[0106] Los grupos se definen del modo siguiente:

- 25 - G.00 = grupo de control
 - G.01 = vacuna atenuada del ejemplo 1 (1 día de vida) + vacuna inactivada del ejemplo 2 (2) días de vida)
 - G.02 = vacuna inactivada del ejemplo 2 (21 días de vida)

30 **[0107]** Después de la identificación, se asignó cada grupo a unidades de aislamiento hasta D53.

[0108] En D0, se vacunó a animales del grupo G.01 con una dosis (al menos 10⁸ UFC) de vacuna atenuada del ejemplo 1 de 0,5 ml por vía oral, suministrada directamente en la cavidad oral.

35 **[0109]** En D21, se vacunó a los animales de los grupos G.01 y G.02 con una dosis de vacuna inactivada del ejemplo 2 por vía intramuscular en la región profunda muscular pectoral izquierda, 0,3 ml/dosis, valoración de *Salmonella* Enteritidis de 10^{8,3} UFC por dosis antes de la inactivación, valoración de *Salmonella* Typhimurium 10⁸ UFC por dosis antes de la inactivación.

40 **[0110]** El grupo G.01 fue vacunado en último lugar, para evitar la contaminación cruzada con la cepa de vacuna atenuada.

45 **[0111]** Se tomó sangre de todos los grupos el D49 justo antes de la prueba de provocación, y a continuación se sometió a prueba el suero recogido en busca de anticuerpos específicos. Los grupos G.00, G.01 y G.02 se sometieron a prueba mediante ensayo ELISA IDEXX y por Prueba de Aglutinación Lenta (PAL).

[0112] El día anterior a la prueba de provocación (D48), se descongeló una parte alícuota de *Salmonella* Heidelberg (*Salmonella* del grupo B), a temperatura ambiente, y a continuación se suspendió en 100 ml de medio de caldo de soja triptona (TSB) Bio Mérieux y se incubó a 37 °C durante 14 horas.

50 **[0113]** Se centrifugó la suspensión bacteriana obtenida y se sembraron sedimentos de la cepa en un TSB precalentado nuevo y se incubó a 37 °C durante un periodo de crecimiento óptimo (5 horas).

55 **[0114]** En cuanto la valoración del cultivo bacteriano en desarrollo evaluada por densidad óptica (medida a 620 nm) fue suficientemente elevada para alcanzar una valoración de la suspensión de 10⁹ UFC/0,2 ml, se usó para infección de los pollos.

[0115] Se sembraron diluciones 10 veces en serie en TSB del inóculo en agar de tripticasa-soja (TSA) y se incubó 24 horas a 37 °C para recuento con 3 repeticiones.

60 **[0116]** En D49, se sometió a todos los grupos a prueba de provocación con caldo de cultivo de *Salmonella* Heidelberg, valorándose 10^{8,9} UFC en 0,2 ml. Se infectó a cada pollo por vía oral.

[0117] Se sacrificaron todos los pollos cuatro días después de la infección (D53). Se muestrearon el bazo y el ciego asépticamente en cada pollo y se colocó en tubos individuales previamente identificados. Al final de la recogida, se procesaron los tubos para reaislamiento de la *Salmonella*.

- 5 - se trituró cada bazo en jeringa de 10 ml y se diluyó en 10 ml de agua de peptona tamponada (APT),
 - se sembraron en placa 200 µl de la dilución en medio de XLT4 + Ampicilina (adición a la velocidad de 50 pg/ml) para numeración (la siembra se extendió en el agar). Se incubaron las placas a 37 °C durante 48 horas.

Fase de pre-enriquecimiento (PE)

10 **[0118]**

- 15 - a continuación se incubaron todos los bazos diluidos a 37 °C durante 16-20 horas,
 - sólo en los bazos negativos para el procedimiento directo se prosiguió completamente a través de las fases siguientes.

Fase de enriquecimiento (E)

20 **[0119]**

- inoculación de la suspensión de bazo "PE" en caldo de Soja Rappaport Vassiliadis (SRV) en una proporción de 1:100 (5 µl en 500 µl) e incubación a 42 °C durante 24 horas.

Aislamiento selectivo

25 **[0120]**

- 30 - siembra en placa de la suspensión de bazo "E" en medio XLT4 + Ampicilina, a continuación incubación a 37 °C durante 48 horas – volumen sembrado en placa de 10 µl. La colonia de *Salmonella* típica era negra o con centro negro, y cuando estaba presente este tipo de colonia, la muestra se valoró como positiva.

[0121] Los resultados se expresaron en ucc/órgano.

35 **[0122]** Se recogió asépticamente el contenido cecal recogido (aproximadamente 1 g) en un tubo estéril, se pesó y se diluyó en 1: 10 peso/volumen en APT hasta 10e-7.

[0123] Se incubaron las diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁵ y 10⁻⁷ a 37 °C durante 16-20 horas (PE) y se trataron adicionalmente para la fase de enriquecimiento (E) y aislamiento selectivo al igual que en las muestras de bazo.

40 **[0124]** Se identificaron las colonias de *Salmonella* y se anotaron las placas positivas.

[0125] Los datos de reaislamiento se analizaron del modo siguiente:

45 para el bazo:

- las muestras negativas después de pre-enriquecimiento y enriquecimiento se contaron como 0 ucc/órgano,
 - las muestras negativas en siembra en placa directa que fueron positivas después de pre-enriquecimiento y enriquecimiento se contaron como 10 ucc/muestra,

50 para el contenido cecal:

- el resultado semicuantitativo se expresó en ucc/g de contenido en órgano, basándose en el procedimiento de dilución y en la positividad (es decir, 50 µl + 450 µl hasta diluciones 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁵ y 10⁻⁷ corresponden, cuando son positivas, a 10^{2.3}, 10^{3.3}, 10^{5.3} y 10^{7.3} ucc/g de contenido cecal de *Salmonella* respectivamente).

55 **[0126]** En la Tabla 1 se resumen los resultados de valoraciones de anticuerpos específicos para todos los pollos inmunizados y no inmunizados, 4 semanas después de la vacunación.

60 **[0127]** Los valores se expresan mediante valoraciones medias geométricas (VMG) para PAL y mediante valoraciones medias aritméticas (VMA) para resultados de ELISA de *Salmonella* Enteritidis de S/R e IP.

Tabla 1:

Grupos	PAL – VMG	SALMONELLA ENTERITIDIS ELISA-AM	
	SALMONELLA TYPHIMURIUM	Relación S/R	Unidades IP
G.00	< 10	0,72	28
G.01	197	0,37	63
G.02	171	0,41	59

[0128] Los resultados serológicos de PAL y ELISA obtenidos en el grupo no vacunado fueron constantemente negativos.

5 [0129] En lo que respecta a los resultados PAL de *Salmonella* Typhimurium, la vacuna inactivada en solitario mostró seroconversión consistente (171 unidades PAL) con un efecto sinérgico sorprendente (15,2 %) de vacuna basada en *Salmonella* Enteritidis atenuada en componente de *Salmonella* Typhimurium (197 unidades PAL).

10 [0130] En relación con los resultados de ELISA de *Salmonella* Enteritidis de G.01 y G.02, la VMA mostró valores superiores de unidades IP (6,8 %) en vacuna atenuada más inactivada que en inactivada en solitario, 63 y 59 respectivamente, con 10/10 sujetos positivos por grupo.

15 [0131] La Tabla 2 resume los resultados de reaislamiento de *Salmonella* Heidelberg en bazos y contenidos cecales 4 días postinfección (expresado como positivo/total y como log₁₀ ucc/bazo o g).

Tabla 2:

Grupos	Bazo				Contenido cecal					log ₁₀ ucc gramo
	-/Tot.	+/Tot. s. d.	+/Tot. d. e.	log ₁₀ ucc bazo	- /Tot.	+/Tot. dilución d. e.				
						-2	-3	-5	-7	
G.00	3/10	3/10	4/10	1,2	0/10	10/10	10/10	7/10	0/10	4,7
G.01	10/10	0/10	0/10	0,0	2/10	8/10	1/10	0/10	0/10	1,9
G.02	8/10	1/10	1/10	0,3	0/10	10/10	8/10	1/10	0/10	3,5

-: Negativos
+: Positivos
s. d.: siembra directa
d. e.: después de enriquecimiento

20 [0132] Tal como se observa en la Tabla 3, 4 días después de la infección la cepa de la prueba de provocación de *Salmonella* Heidelberg mostró su capacidad para alcanzar y colonizar los órganos internos del grupo de control con 0/10 muestras negativas y una numeración significativa de *Salmonella* de 10e1,2 ucc/órgano y 10e4,7 ucc/g, en bazo y contenido cecal respectivamente.

25 [0133] En relación con los resultados de bazo, la mejor protección contra la prueba de provocación de *Salmonella* Heidelberg fue proporcionada por vacuna inactivada asociada con vacuna atenuada (G.01) con Δ = 10^{1,2} ucc/bazo en comparación con el grupo de control. También se obtuvieron resultados significativos en el grupo G.02 por vacuna inactivada usada en solitario (Δ = 10^{0,9} ucc/bazo en comparación con el grupo de control).

30 [0134] En relación con los resultados de contenido cecal, la vacuna inactivada asociada con vacuna atenuada (G.01) mostró un muy buen nivel de protección con un Δ de 10^{2,8} ucc/bazo en comparación con el grupo de control. La vacuna inactivada mostró un nivel significativo de protección frente a contenido cecal con Δ = 10^{1,2} en comparación con el grupo de control.

35 [0135] Los resultados serológicos del grupo G.01 mostraron el efecto sinérgico de inyección de vacuna atenuada a 1 día de vida en seroconversión de la vacuna inactivada. El efecto de cebado cuantificable fue del 6,8 % para el componente de *Salmonella* Enteritidis (63 unidades IP ELISA) y un sorprendente 15,2 % para el componente de *Salmonella* Typhimurium (197 unidades PAL) en comparación con la vacuna inactivada en solitario.

40 [0136] La vacuna inactivada en asociación con la vacuna atenuada mostró un efecto protector pleno para bazo y también contra invasión de contenido fecal con *Salmonella* Heidelberg que la vacuna inactivada en solitario, con Δ = 10^{1,2} ucc/bazo y Δ = 10^{2,8} ucc/gramo de contenido cecal, en comparación con los resultados de control. Existe un claro aumento de protección entre grupos inducido por cebado de vacuna de *Salmonella* Enteritidis atenuada en vacuna de *Salmonella* Enteritidis + *Salmonella* Typhimurium inactivada.

45 **EJEMPLO 4:**

[0137] Se realizó el mismo experimento tal como se describe en el ejemplo 3 con la salvedad de que la cepa *Salmonella* de la prueba de provocación no fue *Salmonella* Heidelberg sino *Salmonella* Infantis.

[0138] En la Tabla 3 se resumen los resultados de valoraciones de anticuerpos específicos para todos los pollos inmunizados y no inmunizados, 4 semanas después de la vacunación.

5 [0139] Los valores se expresan mediante valoraciones medias geométricas (VMG) para PAL y mediante valoraciones medias aritméticas (VMA) para resultados ELISA de *Salmonella* Enteritidis de S/R e IP.

Tabla 3:

Grupos	PAL – VMG	SALMONELLA ENTERITIDIS ELISA - VMA	
	SALMONELLA TYPHIMURIUM	Relación S/R	Unidades IP
G.00	< 10	1,27	00
G.01	184	0,40	60
G.02	139	0,44	56

10 [0140] Los resultados serológicos de PAL y ELISA obtenidos del grupo no vacunado fueron constantemente negativos.

15 [0141] En relación con los resultados PAL de *Salmonella* Typhimurium, la vacuna inactivada en solitario mostró seroconversión consistente (139 unidades PAL) con un efecto sinérgico sorprendente de vacuna de *Salmonella* Enteritidis atenuada en componente de *Salmonella* Typhimurium (184 unidades PAL).

20 [0142] En relación con los resultados ELISA de G.01 y G.02 *Salmonella* Enteritidis, la VMA mostró valores más elevados en unidades IP en vacuna atenuada más inactivada que en inactivada en solitario, 60 y 56 respectivamente, con 10/10 sujetos positivos por grupo.

[0143] La Tabla 4 resume los resultados de reaislamiento de *Salmonella* Infantis en bazos y contenidos cecales 7 días después de la infección (expresado como positivo/total y como log₁₀ ucc/bazo o g).

Tabla 4:

Grupos	Bazo				Contenido cecal			
	-/Tot.	+/Tot. s. d.	+/Tot d. e.	log ₁₀ ucc bazo	-/Tot.	+/Tot. dilución d. e.		log ₁₀ ucc gramo
						-5	-7	
G.00	0/10	9/10	1/10	2,3	0/10	10/10	4/10	6,1
G.01	5/10	3/10	2/10	0,9	1/10	1/10	0/10	2,9
G.02	5/10	2/10	3/10	0,7	0/10	3/10	0/10	3,9

-: Negativos
 +: Positivos
 s. d.: siembra directa
 d. e.: después de enriquecimiento

25 [0144] Tal como se observa en la Tabla 4, 7 días después de la infección la cepa de la prueba de provocación de *Salmonella* Infantis mostró su capacidad para alcanzar y colonizar los órganos internos del grupo de control con 0/10 muestras negativas y una numeración significativa de *Salmonella* de 10^{2,3} ucc/órgano y 10^{6,1} ucc/g, en bazo y contenido cecal respectivamente.

30 [0145] En relación con los resultados de bazo, se proporcionó una buena protección contra la prueba de provocación de *Salmonella* Infantis por vacuna inactivada asociada con vacuna atenuada (G.01) con Δ = 10^{1,4} ucc/bazo en comparación con el grupo de control.

35 [0146] En relación con los resultados de contenido cecal, la vacuna inactivada asociada con vacuna atenuada (G.01) mostró un nivel muy bueno de protección con un Δ de 10^{3,2} ucc/bazo en comparación con el grupo de control. La vacuna inactivada mostró un nivel significativo de protección contra el contenido cecal con Δ = 10^{2,2} en comparación con el grupo de control.

40 [0147] Los resultados serológicos del grupo G.01 mostraron el efecto sinérgico de inyección de vacuna atenuada a 1 día de vida en seroconversión de vacuna inactivada. El efecto de cebado cuantificable fue del 7 % para componente de *Salmonella* Enteritidis (60 unidades IP ELISA) y 32 % para componente de *Salmonella* Typhimurium (184 unidades PAL) en comparación con vacuna inactivada en solitario.

45 [0148] La vacuna inactivada en asociación con vacuna atenuada mostró un mejor efecto protector principalmente para protección cecal (Δ = 10^{3,2} ucc/gramo) y una protección similar a vacuna inactivada en solitario en bazos con Δ = 10^{1,4} ucc/órgano, en comparación con resultados de control.

EJEMPLO 5:

[0149] Se realizó el mismo experimento tal como se describe en el ejemplo 3 con la salvedad de que la cepa *Salmonella* de la prueba de provocación no fue *Salmonella* Heidelberg sino *Salmonella* Virchow.

[0150] En la Tabla 5 se resumen los resultados de valoraciones de anticuerpos específicos para todos los pollos inmunizados y no inmunizados, 4 semanas después de la vacunación.

[0151] Los valores se expresan mediante valoraciones medias geométricas (VMG) para PAL y mediante valoraciones medias aritméticas (VMA) para resultados de ELISA S/R e IP para *Salmonella* Enteritidis.

Tabla 5:

Grupos	PAL – VMG	SALMONELLA ENTERITIDIS ELISA - VMA	
	SALMONELLA TYPHIMURIUM	Relación S/R	Unidades IP
G.00	< 10	1,07	00
G.01	160	0,44	56
G.02	149	0,50	50

[0152] Los resultados serológicos de PAL y ELISA obtenidos del grupo no vacunado fueron constantemente negativos.

[0153] En relación con los resultados para PAL de *Salmonella* Typhimurium, la vacuna inactivada en solitario mostró una seroconversión consistente (149 unidades PAL) con un sorprendente efecto sinérgico de la vacuna a base de *Salmonella* Enteritidis atenuada en el componente de *Salmonella* Typhimurium (160 unidades PAL).

[0154] En relación con los resultados ELISA de *Salmonella* Enteritidis de G.01 y G.02, la VMA mostró un valor superior de unidades IP en vacuna atenuada más inactivada que en inactivada en solitario, 56 y 50 respectivamente, con 10/10 sujetos positivos por grupo.

[0155] La Tabla 6 resume los resultados de reaislamiento de *Salmonella* Virchow en bazos y contenidos cecales 4 días después de la infección (expresado como positivos/totales y como log₁₀ ucc/bazo o g).

Tabla 6:

Grupos	Bazo				Contenido cecal			
	-/Tot.	+/Tot. s. d.	+/Tot. d. e.	log ₁₀ ucc bazo	-/Tot.	+/Tot. dilución d. e.		log ₁₀ ucc gramo
						-5	-7	
G.00	0/10	8/10	2/10	2,4	0/10	10/10	6/10	6,5
G.01	9/10	0/10	1/10	0,1	0/10	5/10	1/10	4,5
G.02	6/10	2/10	2/10	0,6	0/10	8/10	3/10	5,5

-: Negativos
 +: Positivos
 s. d.: siembra directa
 d. e.: después de enriquecimiento

[0156] Tal como se observa en la Tabla 6, 4 días después de la infección la cepa de la prueba de provocación de *Salmonella* Virchow mostró su capacidad para alcanzar y colonizar los órganos internos del grupo de control con 0/10 muestras negativas y numeración significativa de *Salmonella* de 10^{2,4} ucc/órgano y 10^{6,5} ucc/g, en bazo y contenido cecal respectivamente.

[0157] En relación con los resultados de bazo, la mejor protección contra la prueba de provocación de *Salmonella* Virchow fue suministrada por vacuna inactivada asociada con vacuna atenuada (G.01) con Δ = 10^{2,3} ucc/bazo en comparación con el grupo de control. También se obtuvieron buenos resultados en el grupo G.02 por vacuna inactivada usada en solitario (Δ = 10^{1,8} ucc/bazo en comparación con el grupo de control).

[0158] En relación con los resultados de contenido cecal, la vacuna inactivada en asociación con vacuna atenuada (G.01) mostró un nivel de protección muy bueno con Δ de 10^{2,0} ucc/bazo en comparación con el grupo de control. La vacuna inactivada mostró un nivel significativo de protección frente a contenido cecal con Δ = 10^{1,0} en comparación con el grupo de control.

[0159] Los resultados serológicos del grupo G.01 mostraron el efecto sinérgico de inyección de la vacuna atenuada a 1 día de vida en la seroconversión de la vacuna inactivada. El efecto de cebado cuantificable fue del 12 % para componente de *Salmonella* Enteritidis (56 unidades IP de ELISA) y un sorprendente 7,4 % para componente de *Salmonella* Typhimurium (160 unidades PAL) en comparación con la vacuna inactivada en solitario.

[0160] La vacuna inactivada en asociación con la vacuna atenuada mostró un mejor efecto protector principalmente para protección de bazo pero también contra invasión de contenido cecal con *Salmonella* Virchow que la vacuna inactivada en solitario, con $\Delta = 10^{2,3}$ ucc/bazo y $\Delta = 10^{2,0}$ ucc/gramo de contenido cecal, en comparación con los resultados de control.

EJEMPLO 6:

[0161] Se realizó el mismo experimento tal como se describe en el ejemplo 3 con la salvedad de que la cepa de *Salmonella* de la prueba de provocación no fue *Salmonella* Heidelberg sino *Salmonella* Hadar. La valoración del inóculo de la prueba de provocación final fue de 10^9 UFC/0,2 ml.

[0162] En la Tabla 7 se resumen los resultados de valoraciones específicas de anticuerpos para todos los pollos inmunizados y no inmunizados, 4 semanas después de la vacunación.

[0163] Los valores se expresan mediante valoraciones medias geométricas (VMG) para PAL y mediante valoraciones medias aritméticas (VMA) para resultados de ELISA S/R e IP para *Salmonella* Enteritidis.

Tabla 7:

Grupos	PAL – VMG	SALMONELLA ENTERITIDIS ELISA - VMA	
	SALMONELLA TYPHIMURIUM	Relación S/R	unidades
G.00	< 10	0,88	12
G.01	211	0,42	58
G.02	171	0,49	51

[0164] Los resultados serológicos de PAL y ELISA obtenidos del grupo no vacunado fueron constantemente negativos.

[0165] En relación con los resultados PAL de *Salmonella* Typhimurium, la vacuna inactivada en solitario mostró una seroconversión consistente (171 unidades PAL) con un sorprendente efecto sinérgico de vacuna basada en *Salmonella* Enteritidis atenuada en el componente de *Salmonella* Typhimurium (211 unidades PAL).

[0166] En relación con los resultados de ELISA para *Salmonella* Enteritidis de G.01 y G.02, la VMA mostró un valor superior de unidades IP (6,8 %) en vacuna atenuada más inactivada que la inactivada en solitario, 58 y 51 respectivamente, con 10/10 sujetos positivos por grupo.

[0167] La Tabla 8 resume los resultados de reaislamiento de *Salmonella* Hadar en bazos y contenidos cecales 4 días después de la infección (expresado como positivo/total y como \log_{10} ucc/bazo o g).

Tabla 8:

Grupos	Bazo				Contenido cecal		
	-/Tot.	+/Tot. s. d.	+/Tot d. e.	\log_{10} ucc bazo	-/Tot.	+/Tot. dilución d. e. -5	\log_{10} ucc gramo
G.00	2/10	4/10	4/10	1,3	0/10	9/10	5,1
G.01	6/10	0/10	4/10	0,4	0/10	5/10	4,3
G.02	3/10	4/10	3/10	1,1	0/10	5/10	4,3

-: Negativos
 +: Positivos
 s. d.: siembra directa
 d. e.: después de enriquecimiento

[0168] Tal como se observa en la Tabla 8, 4 días después de la infección la cepa de prueba de provocación de *Salmonella* Hadar mostró capacidad para alcanzar y colonizar los órganos internos del grupo de control con 2/10 y 0/10 muestras negativas y una numeración significativa de *Salmonella* de $10^{1,3}$ ucc/órgano y $10^{5,1}$ ucc/g, en bazo y contenido cecal respectivamente.

[0169] En relación con los resultados de bazo, la mejor protección contra la prueba de provocación de *Salmonella* Hadar fue suministrada por vacuna inactivada asociada con vacuna atenuada (G.01) con $\Delta = 10^{0,9}$ ucc/bazo en comparación con el grupo de control. Se consiguieron también resultados limitados en el grupo G.02 por vacuna inactivada usadas en solitario ($\Delta = 10^{0,2}$ ucc/bazo en comparación con el grupo de control).

[0170] En relación con los resultados de contenido cecal, la vacuna inactivada asociada con vacuna atenuada (G.01) o la vacuna inactivada (G.02) mostraron el mismo nivel de protección con una Δ de $10^{0.8}$ ucc/bazo en comparación con el grupo de control.

5 **[0171]** Los resultados del grupo serológico G.01 mostraron el efecto sinérgico de la inyección de vacuna atenuada a 1 día de vida en la seroconversión de la vacuna inactivada. El efecto de cebado cuantificable fue del 14 % para el componente de *Salmonella* Enteritidis (58 unidades IP de ELISA) y un sorprendente 23 % para el componente de *Salmonella* Typhimurium (211 unidades PAL) en comparación con la vacuna inactivada en solitario.

10 **[0172]** La vacuna inactivada en asociación con vacuna atenuada mostró un mejor efecto protector principalmente contra la invasión de contenido cecal con *Salmonella* Hadar que la vacuna inactivada en solitario, en comparación con los resultados de control.

15 **[0173]** La Tabla 9 resume los resultados de los ejemplos 3 a 6 en relación con aislamiento de *Salmonella* en bazos de pollos infectados después de la prueba de provocación con *Salmonella* de serovariedad heteróloga.

Tabla 9:

Número de muestras de bazo para aislamiento positivo/negativo después de prueba de provocación, para diversos tratamientos			
Grupos de tratamiento	Positivo bazos	Negativo bazos	Total
Atenuada + inactivada	10	30	40
Sólo inactivada	18	22	40
Total	28	52	80

20 **[0174]** Estos resultados muestran una diferencia significativa en el riesgo del 6,5 % con la prueba K2 y una diferencia significativa en el riesgo unilateral del 5 % con la prueba de Fischer exacta entre el grupo vacunado dos veces según un procedimiento de la presente descripción (por ejemplo, primero con la vacuna a base de *Salmonella* atenuada y segundo con la vacuna a base de *Salmonella* inactivada) y el grupo vacunado sólo con la vacuna a base de *Salmonella* inactivada.

25 **[0175]** El procedimiento que usa una primo-administración con una vacuna a base de *Salmonella* Enteritidis atenuada (grupo D) mejoró la eficacia de la *Salmonella* Enteritidis / *Salmonella* Typhimurium de la vacuna inactivada oleosa bivalente contra una prueba de provocación de serovariedad heteróloga del grupo B, y también de los grupos C1 y C2 que no estaban presentes en las fórmulas de vacuna que se emplearon. Esta mejora se muestra significativamente mediante la reducción de la invasión del bazo después de la prueba de provocación con *Salmonella* de una serovariedad heteróloga, en comparación con el grupo vacunado dos veces según un
30 procedimiento de la presente descripción y el grupo vacunado sólo con la vacuna a base de *Salmonella* inactivada.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna para su uso en la protección cruzada de animales aviares contra una enfermedad causada por al menos una *Salmonella* heteróloga y/o en la prevención del transporte de al menos una *Salmonella* heteróloga en animales aviares, en la que la vacuna está formulada para la administración en la forma de un régimen de sensibilización-refuerzo que comprende al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D, administrada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D, en la que la primo-administración y la administración de refuerzo se administran con un intervalo de entre 2 y 18 semanas.
- 10
- 15 2. La vacuna según la reivindicación 1, en la que el grupo B de *Salmonella* comprende *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Saint-Paul, *Salmonella* Brandenburg.
- 20 3. La vacuna según la reivindicación 2, en la que la al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B de *Salmonella* es *Salmonella* Typhimurium.
- 25 4. La vacuna según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el grupo D de *Salmonella* comprende *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum.
- 30 5. La vacuna según la reivindicación 4, en la que la al menos una *Salmonella* atenuada o la al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D de *Salmonella* es *Salmonella* Enteritidis.
- 35 6. La vacuna según la reivindicación 1:
que comprende además al menos una administración de *Salmonella* del grupo D entre aproximadamente 2 y aproximadamente 18 semanas después de la administración de la al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B.
- 40 7. Un kit o conjunto de vacunación para vacunación de animales aviares, que comprende al menos dos viales y un prospecto incluido en el envase con instrucciones de administración, en el que los al menos dos viales comprenden una *Salmonella* atenuada y una *Salmonella* inactivada, en el que el kit o conjunto de vacunación está ensablado de forma operativa para realizar la administración de la vacuna a un animal de la familia aviar y para desencadenar una respuesta inmunitaria segura y protectora contra *Salmonella*, en el que el primer vial comprende una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* atenuada del grupo D y el segundo vial comprende una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* inactivada del grupo B y de *Salmonella* inactivada del grupo D.
- 45 8. El kit o conjunto de vacunación según la reivindicación 7, en el que los al menos dos viales comprenden una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* atenuada del grupo D para primo-administración múltiple y una composición inmunógena o una vacuna a base de *Salmonella* inactivada del grupo B y de *Salmonella* inactivada del grupo D para administración de refuerzo múltiple.
- 50 9. Uso de una composición de vacuna para la fabricación de un medicamento para la protección cruzada de animales aviares contra una enfermedad causada por al menos una *Salmonella* heteróloga y/o la prevención del transporte de al menos una *Salmonella* heteróloga en animales aviares, en el que la vacuna está formulada para una administración en forma de un régimen de sensibilización-refuerzo que comprende al menos una primo-administración de una composición inmunógena o vacuna atenuada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario y al menos una *Salmonella* atenuada del grupo D, administrada a un animal aviar antes de al menos una administración de refuerzo de una composición inmunógena o vacuna inactivada, que comprende un excipiente, diluyente o vehículo aceptable desde el punto de vista farmacéutico o veterinario, y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B y al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D, en el que la primo-administración y la administración de refuerzo se administran con un intervalo de entre 2 y 18 semanas.
- 55
- 60 10. El uso según la reivindicación 9, en el que el grupo B de *Salmonella* comprende *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Braenderup, *Salmonella* Agona, *Salmonella* Bredeney, *Salmonella* Heidelberg, *Salmonella* Indiana, *Salmonella* Saint-Paul, *Salmonella* Brandenburg.

11. El uso según la reivindicación 10, en el que la al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B de *Salmonella* es *Salmonella* Typhimurium.
- 5 12. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, en el que el grupo D de *Salmonella* comprende *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Panama, *Salmonella* Dublin, *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Pullorum.
13. El uso según la reivindicación 12, en el que la al menos una *Salmonella* atenuada o la al menos una *Salmonella* inactivada del grupo D de *Salmonella* es *Salmonella* Enteritidis.
- 10 14. El uso según la reivindicación 9:
que comprende además al menos una administración de *Salmonella* del grupo D entre aproximadamente 2 y aproximadamente 18 semanas después de la administración de la al menos una *Salmonella* inactivada del grupo B.

Figura 1

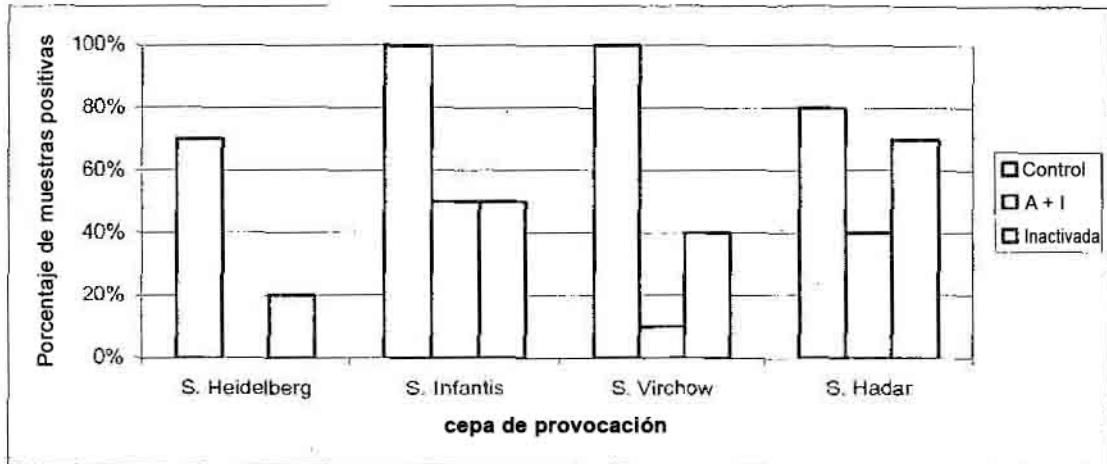


Figura 2

