

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 023**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.07.2006 E 10154158 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2204184**

54 Título: **Vacuna de lawsonia y métodos de uso de la misma**

30 Prioridad:

15.07.2005 US 699946 P
12.07.2006 US 457039

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.08.2017

73 Titular/es:

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC.
(100.0%)
2621 NORTH BELT HIGHWAY
ST. JOSEPH MO 64506-2002, US

72 Inventor/es:

ROOF, MICHAEL B. y
KROLL, JEREMY J.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 630 023 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 lawsonia y métodos de uso de la misma

Antecedentes de la invención**Campo de la invención**

- 5 Se describen métodos mejorados de vacunación para la inmunización contra la enteritis proliferativa porcina, conocida como ileítis, que es provocada por una bacteria intracelular obligada, la *Lawsonia intracellularis* (*Lawsonia* o *L. intracellularis*). Específicamente, se describen métodos para proporcionar una protección incrementada contra *L. intracellularis* mediante la vacunación de cerdas preñadas; mediante la vacunación de cerdas preñadas y posterior vacunación de los cochinitillos en aproximadamente las primeras tres semanas de vida; y mediante la vacunación de cochinitillos en los primeros 25 ó 26 días de vida, respectivamente.

Descripción de la Técnica Anterior

- 15 La enteritis proliferativa porcina (PPE) es una enfermedad natural que puede afectar a los cerdos desde las etapas de destetado hasta las de adulto joven. Se ha determinado que el agente causante es la *Lawsonia intracellularis*, una bacteria intracelular obligada, gram-negativa, que no puede ser cultivada empleando métodos bacteriológicos normales o medios convencionales libres de células, y se cree que es necesario que haya células para su crecimiento. S. McOrist y col., *Infection and Immunity*, Vol. 61, Nº 19, 4286-4292 (1993) y G. Lawson y col., *J. of Clinical Microbiology*, Vol. 31, Nº 5, 1136-1142 (1993) discuten la cultivación de *L. intracellularis* usando monocapas de células epiteliales de intestino de rata IEC-18 en matraces convencionales de cultivo de tejidos. En las Patentes de EE.UU. Nº 5.714.375 y 5.885.823, se describe el cultivo de *L. intracellularis* en células hospedantes suspendidas.

- 20 En el estado de la técnica se conocen bien las cepas de bacterias *L. intracellularis* patogénicas y no patogénicas atenuadas. Por ejemplo, los documentos WO 96/39629 y WO 05/011731 describen cepas no patogénicas atenuadas de *L. intracellularis*. Otras cepas de bacterias atenuadas de *L. intracellularis* son descritas en los documentos WO 02/26250 y WO 03/00665. La enfermedad se caracteriza en primer lugar por su patología macroscópica y microscópica, y más tarde por la presencia de la bacteria intracelular dentro de las células afectadas. La característica patológica característica de la enfermedad es la proliferación de células epiteliales inmaduras en las criptas del íleon (parte final del intestino delgado), del intestino grueso o de ambos. Las secciones de tejido infectado se caracterizan por una mucosa engrosada enrojecida que se parece a una "manguera de jardín", y lesiones intestinales. El engrosamiento del intestino previene en última instancia la función normal del intestino, las capacidades de absorción, y la transferencia de nutrientes. Los efectos clínicos de la enfermedad son pérdida de peso crónica, incapacidad de que un animal joven crezca o gane peso a la razón promedio acostumbrada ("unthriftiness"), diarrea, y muerte. La enfermedad es de importancia económica debido a la pérdida por muertes, el aumento de costes de medicación, la escasa ganancia de peso y la disminución de conversión del alimento en los animales afectados. Los casos clínicos de ileítis se observan especialmente en cerdos de 6-20 semanas de edad. Sin embargo, la presencia de *L. intracellularis* se ha confirmado (mediante PCR) en cerdos recientemente destetados (3-4 semanas de edad), lo que sugiere que la exposición a *L. intracellularis* tiene lugar en el criadero y quizás es originada a partir de madres positivas en *Lawsonia* (Mauch y Bilkei (2004) *Vet Rec* 155: 532; Marsteller et al. (2003). *Swine Health Prod* 11:127-130; Stege y col. (2004). *Vet Micro* 104: 197-206). Estas observaciones subrayan la importancia de la incorporación de estrategias de prevención tales como la vacunación temprana en el sistema de producción. Walter et al. 2004 (*J. of Swine Health Prod.* 12(6): 310-313) describe la pauta de vacunación para *Lawsonia intracellularis*.

- 45 Las actuales estrategias de vacunación para la inmunización contra la ileítis implican la administración oral de la vacuna a cerdos sensibles a *Lawsonia* desde tan sólo tres semanas de edad en adelante, debido a que los cochinitillos por debajo de este grupo de edad podrían presentar anticuerpos maternos positivos para la *L. intracellularis* debido a una exposición o vacunación previa de la cerda. Antes de los métodos aquí descritos se creía que la presencia de anticuerpos maternos o de otros factores lactogénicos podría interferir potencialmente con la eficacia de las vacunaciones de los cochinitillos, debido a que los anticuerpos maternos tienen la capacidad de neutralizar la vacuna antes de que el sistema inmune del cochinitillo pueda reconocerla y comenzar a segregar sus propios anticuerpos. Por lo tanto, la vacunación de cochinitillos jóvenes se ha evitado en favor de la inmunidad materna.

Compendio de la invención

- 50 La presente invención supera las deficiencias de la técnica anterior y proporciona el uso de una cantidad eficaz de antígeno de *Lawsonia intracellularis* para la preparación de un medicamento para proporcionar protección incrementada contra la infección por *Lawsonia intracellularis* en un animal joven, en donde

(a) la madre de dicho animal joven se va a vacunar con dicho medicamento mientras que dicha madre esta en periodo de gestación de dicho animal joven, y

- 55 (b) dicho animal joven se va a vacunar con una dosis eficaz de dicho medicamento durante las tres primeras semanas de vida,

en donde dicho animal joven es un lechón, y, en donde dicho antígeno es una bacteria *Lawsonia intracellularis* viva modificada.

Se describe un método para administrar una cantidad inmunológicamente eficaz de vacuna a cerdas, y/o a cochinitos jóvenes en las primeras semanas de edad, con el fin de inmunizarlos contra la ileítis. Se descubrió que la transferencia de inmunidad materna desde una cerda vacunada contra *Lawsonia*, o expuesta a ella, a los cochinitos proporciona algo de protección contra la ileítis en los cochinitos durante al menos 6 semanas después del nacimiento. Sin embargo, a menos que fueran vacunados, rápidamente se volvían susceptibles a la enfermedad. Se ha demostrado que el uso de la vacuna en animales preñados en dosis elevadas, después de dosis repetidas, e incluso cuando se administraba durante la segunda o la tercera etapa de gestación, era sorprendentemente seguro y eficaz para proporcionar inmunidad materna.

Se describe un método para la vacunación de animales preñados (preferiblemente cerdos) contra las infecciones de *L. intracellularis*, en el que dichos animales preñados son vacunados con antígeno de *L. intracellularis*. Adicionalmente, se describe la vacunación con altas dosis y/o con dosis repetidas de antígeno de *L. intracellularis*. Además se describe un método para la vacunación de animales preñados (preferiblemente cerdos) contra infecciones de *L. intracellularis*, en el que dichos animales preñados son vacunados durante la segunda o la tercera etapa de gestación, preferiblemente dichos animales preñados son vacunados con altas dosis y/o con repetidas dosis de antígeno de *L. intracellularis*.

Se describe un método para vacunar cerdos contra la ileítis mediante la administración de una vacuna de *Lawsonia* a una cerda preñada al menos una vez antes del parto, preferiblemente dos veces antes del parto y más preferiblemente tres veces antes del parto ("dosis repetidas"). Preferiblemente las cerdas preñadas se vacunan con altas dosis del antígeno de *L. intracellularis*. Cuando la vacuna se administra a la cerda tres veces, la primera administración debería producirse entre 50 y 60 días antes del parto, preferiblemente entre 52 y 58 días antes del parto, y más preferiblemente entre 54 y 56 días antes del parto. La segunda administración debería producirse entre 30 y 40 días antes del parto, preferiblemente entre 32 y 38 días antes del parto, y más preferiblemente entre 34 y 36 días antes del parto. La administración final debería producirse entre 10 y 20 días antes del parto, preferiblemente entre 12 y 18 días antes del parto, y más preferiblemente entre 14 y 16 días antes del parto. Una vez la cerda ha dado a luz se administra la vacuna a cada uno de los cochinitos, después de que son destetados y hasta la matanza, pero preferiblemente antes de que alcancen las tres semanas de edad, en cualquier caso, al menos en los primeros 10 a 25-26 días de edad, respectivamente (preferiblemente entre 16 y 26 días de edad), más preferiblemente entre 10 y 21 días de edad, incluso más preferiblemente entre 15 y 21 días de edad, y aún más preferiblemente entre 19 y 21 días de edad. Preferiblemente la vacuna se administra a cada uno de los cochinitos antes de los 26 días de edad, preferiblemente entre los 16 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 18 y los 24 días de edad, aún más preferiblemente entre los 19 y los 22 días de edad, y aún más preferiblemente a los 21 días de edad.

Se describe un método para vacunar cerdas preñadas así como cochinitos recién nacidos. Preferiblemente, las cerdas preñadas y los cochinitos recién nacidos se vacunan como se ha descrito anteriormente.

También se descubrió que la inmunidad materna, inesperadamente, no interfiere con la vacunación exitosa de los cochinitos al poco de nacer, y de hecho los cochinitos vacunados en las primeras tres semanas después del parto, tal como se describe en la presente memoria, presentan menos patología macroscópica asociada a la enfermedad en comparación con los cochinitos no vacunados.

Por tanto, se describe un método para la vacunación de animales jóvenes (preferiblemente de cochinitos jóvenes) en las primeras tres semanas desde el parto contra infecciones de *L. intracellularis*. Preferiblemente, dichos animales jóvenes (preferiblemente cochinitos jóvenes) se vacunan a la edad de 21 ± 5 días. Incluso más preferiblemente, dichos animales jóvenes (preferiblemente cochinitos jóvenes) se vacunan respectivamente a la edad de 10 a 25 y 26 días. Incluso más preferiblemente, dichos animales jóvenes (preferiblemente cochinitos jóvenes) se vacunan a la edad de 10 a 21 días. Incluso más preferiblemente, dichos animales jóvenes (preferiblemente cochinitos jóvenes) se vacunan respectivamente a la edad de 12 a 21 días. Incluso más preferiblemente, dichos animales jóvenes (cochinitos jóvenes preferiblemente) se vacunan respectivamente a la edad de 15 a 21 días, más preferiblemente a la edad de 19 a 21 días. Preferiblemente la vacuna se administra a cada uno de los cochinitos antes de los 26 días de edad, preferiblemente entre los 16 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 18 y los 24 días de edad, aún más preferiblemente entre los 19 y los 22 días de edad, y aún más preferiblemente a los 21 días de edad. La vacuna para uso puede ser cualquier vacuna que proporcione protección contra *L. intracellularis*. Preferiblemente, la vacuna es una vacuna de virus vivo de *L. intracellularis*. Más preferiblemente, la vacuna es Enterisol® Ileitis B3903 (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.).

La vacuna se administra a animales, preferiblemente a mamíferos, y aún más preferiblemente a cerdos, en cualquier modo convencional, más preferiblemente mediante un empapado oral.

La dosificación que se va a administrar dependerá del caso particular, pero en cualquier caso, es la cantidad suficiente para inducir una respuesta inmune de anticuerpo protector y/o mediada por células contra la ileítis. La dosificación apropiada puede determinarse empleando medios conocidos en la técnica sin necesidad de experimentación indebida, y casi siempre será contingente con la vacuna concreta utilizada. En muchos casos, una

dosificación adecuada oscila entre 0,1 mL y 10 mL, y preferiblemente entre aproximadamente 1 mL y 5 mL. En el caso de Enterisol® Ileititis, la dosificación es preferiblemente al menos 2 mL por cerdo. También se pueden calcular las dosis en una base de peso seco por peso del cerdo para preparar vacunaciones no acuosas.

- 5 Los estudios presentados en los ejemplos mostrados a continuación fueron llevados a cabo para evaluar la eficacia de la vacuna en cerdos derivados de cerdas expuestas a *Lawsonia intracellularis* y de cerdas negativas en *Lawsonia*. Además, los estudios evaluaron si existía alguna interferencia materna procedente de la vacunación de los cochinitos de tres semanas de edad.

Descripción detallada de la invención

- 10 El término "vacunación" o "vacunar" como se utiliza en la presente memoria significa, pero no está limitado a ello, un procedimiento que incluye la administración de un antígeno de *L. intracellularis* a un animal, en el que dicho antígeno de *L. intracellularis*, cuando se administra a dicho animal provoca o es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en dicho animal contra la *L. intracellularis*.

- 15 El término "animal" tal como se usa en la presente memoria, significa aunque sin limitarse a ellos, pájaros, peces y mamíferos tales como ganado, cerdos, caballos y primates. Sin embargo, preferiblemente, el animal es un cerdo, preferiblemente un cochinito de 10 a 25 y 26 días de edad, respectivamente, preferiblemente entre 10 y 21 días de edad, incluso más preferiblemente entre 15 y 21 días de edad, y aún más preferiblemente entre 19 y 21 días de edad. Preferiblemente, el cochinito tiene menos de 26 días de edad, preferiblemente entre 16 y 26 días de edad, más preferiblemente entre 18 y 24 días de edad, aún más preferiblemente entre 19 y 22 días de edad, y aún más preferiblemente 21 días de edad.

- 20 El término "una dosis eficaz" o "dosificación eficaz" tal como se usa en la presente memoria significa, aunque sin limitarse a ello, una cantidad de antígeno que provoca o que es capaz de provocar una respuesta inmune en un animal, al que se le administra dicha dosis eficaz de antígeno de *L. intracellularis*.

- 25 Una "respuesta inmunológica o inmune" a una composición o vacuna es el desarrollo en el huésped de una respuesta inmune celular y/o mediada por anticuerpos a la composición o vacuna de interés. Así, la terminología "provoca o es capaz de provocar una respuesta inmunitaria" significa, pero no está limitada a un proceso inmunológico en un anfitrión caracterizado por que dicho anfitrión desarrolla una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos a la composición o vacuna de interés. Habitualmente, una "respuesta inmune" incluye, pero no se limita a ello, uno o más de los siguientes efectos: la producción o activación de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras y/o células T citotóxicas y/o células T yd, dirigidas específicamente a un antígeno o antígenos incluidos en la composición o vacuna de interés. Preferiblemente, el hospedante exhibirá una respuesta inmunológica terapéutica o protectora, de modo que la resistencia a la nueva infección resultará reforzada y/o la gravedad clínica de la enfermedad quedará reducida. Una protección de este tipo quedará demostrada por una reducción, que incluye una reducción de la gravedad, o por la carencia de los síntomas asociados con infecciones de hospedante según se han descrito anteriormente.

- 35 La cantidad de antígeno que es eficaz para provocar una respuesta inmunitaria o es capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un animal depende de los ingredientes de la vacuna y el programa de administración. Típicamente, cuando se usa antígeno bacteriano muerto en la vacuna, la vacuna contiene una cantidad de aproximadamente 10^3 a aproximadamente 10^9 bacterias por dosis, preferiblemente de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^8 bacterias por dosis, y aún más preferiblemente de aproximadamente 10^5 a aproximadamente 10^6 bacterias por dosis.

- 40 En particular, cuando se usan bacterias *L. intracellularis* vivas modificadas en las vacunas, por ejemplo los elementos aislados de bacterias B3903, N° de acceso ATCC PTA-4926 y el elemento aislado designado N34NP40wk, N° de acceso ATCC 55783 (ambos descritos en el documento WO 96/39629 y en el WO 05/011731), la dosis recomendada para ser administrada al animal susceptible es preferiblemente de aproximadamente 3,0 TCID₅₀ (dosis infectiva de cultivo de tejido de punto final 50%)/dosis a aproximadamente 6,0 TCID₅₀/dosis, y más preferiblemente de aproximadamente 4,0 TCID₅₀/dosis a aproximadamente 5,0 TCID₅₀/dosis. Preferiblemente el título de la vacuna es aproximadamente 4,9 TCID₅₀/dosis según se determina por el ensayo de dilución de punto final de la Dosis Infecciosa del 50% de los Cultivos Tisulares inoculados (TCID₅₀).

- 50 Vacunas sub-unidad son administradas normalmente con un nivel de inclusión de antígenos de al menos 0,2 µg de antígeno por dosis, preferiblemente con aproximadamente 0,2 hasta aproximadamente 400 µg/dosis, todavía más preferiblemente con aproximadamente 0,3 hasta aproximadamente 200 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,35 hasta aproximadamente 100 µg/dosis, aún más preferiblemente con aproximadamente 0,4 hasta aproximadamente 50 µg/dosis, aún más preferiblemente con aproximadamente 0,45 hasta aproximadamente 30 µg/dosis, aún más preferiblemente con aproximadamente 0,6 hasta aproximadamente 15 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 0,75 hasta aproximadamente 8 µg/dosis, incluso más preferiblemente con aproximadamente 1,0 hasta aproximadamente 6 µg/dosis, y aún más preferiblemente con aproximadamente 1,3 hasta aproximadamente 3,0 µg/dosis.

En general, la cantidad de antígeno se encontrará entre 5 y 5000 microgramos, y entre $10^{2,0}$ y $10^{9,0}$ TCID₅₀,

preferiblemente entre $10^{3.0}$ y $10^{6.0}$ TCID₅₀, más preferiblemente entre $10^{4.0}$ y $10^{5.0}$ TCID₅₀, cuando se emplean bacterias purificadas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "altas dosis" significa en general al menos tres veces la cantidad de antígeno de una dosis sencilla usada normalmente para la vacunación de animales adultos. En particular, el término "altas dosis" significa en relación a *L. intracellularis* vivas modificadas una cantidad de al menos $3 \times 10^{3.0}$ a $3 \times 10^{9.0}$ TCID₅₀, preferiblemente de aproximadamente $3 \times 10^{4.5}$ a $3 \times 10^{6.0}$ TCID₅₀. En particular, el término "altas dosis" significa en relación a antígeno de *L. intracellularis* muertas una cantidad de al menos $3 \times 10^{4.0}$ a $3 \times 10^{9.0}$ organismos o bacterias, preferiblemente de aproximadamente $3 \times 10^{6.0}$ a $3 \times 10^{8.0}$ organismos o bacterias. En particular, el término "altas dosis" significa en relación a cualquier sub-unidad de antígeno de *L. intracellularis* una cantidad de al menos $3 \times 0,2$ a aproximadamente 3×400 (de 0,6 a aproximadamente 1200) µg/dosis. En esta solicitud, se administraron altas dosis de antígeno de *L. intracellularis* a cerdas preñadas con el fin de inducir una respuesta inmunológica aumentada en la cerda preñada que se transmitiera al recién nacido y proporcionara algún grado de inmunidad a los cochinitos recién nacidos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "dosis repetidas" significa la administración del antígeno de *L. intracellularis* en al menos dos veces, preferiblemente en tres veces. Anteriormente se han presentado ejemplos de un régimen de vacunación de "dosis repetidas" para cerdas preñadas.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "protección aumentada" significa, aunque sin limitarse a ello, una reducción significativa estadísticamente en la gravedad o en la frecuencia de uno o más síntomas clínicos y/o en el desarrollo de lesiones que están asociadas a infecciones de *L. intracellularis* (por ejemplo, la frecuencia de lesiones cruzadas determinada mediante el método definido en el Ejemplo 1 y según los criterios definidos en el mismo, etc.) en un grupo de animales vacunados frente a un grupo de animales de control no vacunados. El término "reducción estadísticamente significativa de los síntomas clínicos" significa, aunque no se limita a ello, que la frecuencia de la incidencia de al menos un síntoma clínico y/o desarrollo de lesión en el grupo de animales vacunados es al menos un 20%, preferiblemente un 30%, incluso más preferiblemente un 40%, aún más preferiblemente un 50%, incluso más preferiblemente un 60%, aún más preferiblemente un 70%, incluso más preferiblemente un 80%, aún más preferiblemente un 90%, y todavía más preferiblemente un 95% menor que en el grupo de control no vacunado tras exposición a bacterias infecciosas de *L. intracellularis*.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "*L. intracellularis*" o "*Lawsonia*" significa la bacteria intracelular curvada gram-negativa descrita con detalle por C. Gebhart y col., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 43, N° 3, 533-538 (1993) y S. McOrist y col., Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Vol. 45, N° 4, 820-825 (1995), se incluye, pero no está limitada a ellos, los elementos aislados descritos en el documento WO 96/39629 y en el documento WO 05/011731. En particular, la terminología "*L. intracellularis*" también significa, pero no está limitada a ellos, los elementos aislados depositados bajo el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 y con número de registro de la ATCC asignado PTA 4926 o número de registro de la ATCC 55783. Ambos elementos aislados se describen en el documento WO 96/39629 y en el documento WO 05/011731, respectivamente. El término "*L. intracellularis*" también significa, aunque no está limitado a ello, cualquier otra cepa de bacterias *L. intracellularis*, o elemento aislado, que tenga preferiblemente las propiedades inmunogénicas de al menos una de las cepas de *L. intracellularis* descritas en el documento WO 96/39629 y en el WO 05/011731, que tenga en particular las propiedades inmunogénicas de al menos uno de los elementos aislados del Tratado de Budapest con el American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209 y que tenga asignado el número de acceso ATCC PTA 4926 o el número de acceso ATCC 55783.

Una cepa o elemento aislado tiene las "propiedades inmunógenas" de al menos una de las cepas de *L. intracellularis* descritas en el documento WO 96/39629 y en el documento WO 05/011731, en particular, de los elementos aislados depositados como número de acceso ATCC PTA 4926 o número de acceso ATCC 55783, cuando es detectable al menos con uno de los anticuerpos específicos anti-*L. intracellularis*, descritos en el documento WO06/01294, en un ensayo de detección que también se describe en el documento WO06/01294. Preferentemente estos anticuerpos se seleccionan de los anticuerpos que tienen los números de referencia 301:39, 287:6, 268:29, 110:9, 113:2 y 268:18. Preferiblemente, el ensayo de detección es un ELISA de tipo sándwich de doble anticuerpo como se describe en los Ejemplos 2 y 3 del documento WO06/12949, en los que se utiliza el anticuerpo 110:9 como un anticuerpo de captura y el anticuerpo 268:29 se utiliza como anticuerpo conjugado. Todos los anticuerpos descritos en el documento WO06/12949 están producidos por células de hibridoma, los cuales están depositados en el Centro para Microbiología Aplicada y Desarrollo (Centre for Applied Microbiology and Research) (CAMR) y en la Colección Europea de Cultivos Celulares (European Collection of Cell Cultures) (ECACC), Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, R.U., como depósito de patente según el Tratado de Budapest. La fecha de depósito fue el 11 de mayo de 2004. La LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 110:9 se depositó satisfactoriamente bajo el N° de reg. de la ECACC 04092204. La LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 113:2 se depositó satisfactoriamente bajo el N° de reg. de la ECACC 04092201. La LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 268:18 se depositó satisfactoriamente bajo el N° de reg. de la ECACC 04092202. La LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 268:29 se depositó satisfactoriamente bajo el N° de reg. de la ECACC 04092206. La LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 287:6 se depositó satisfactoriamente bajo el N° de reg. de la ECACC 04092203. La LÍNEA CELULAR DE HIBRIDOMA 301:39 se depositó satisfactoriamente bajo el N° de reg. de la ECACC 04092205.

La terminología "antígeno de *L. intracellularis*" tal como se utiliza en la presente memoria significa, pero no está limitada a ello, cualquier composición de materia, que comprende por lo menos un antígeno que puede inducir, estimular o potenciar la respuesta inmunitaria contra una infección causada por *L. intracellularis*, cuando se administra a un animal. Preferiblemente, dicho antígeno de *L. intracellularis* es una bacteria *L. intracellularis* completa, en particular en una forma inactivada (una así llamada bacteria muerta), una bacteria *L. intracellularis* viva modificada o atenuada (una así llamada MLB), cualquier sub-unidad, polipéptido o componente de *L. intracellularis*, o cualquier vector quimérico, que comprende al menos una secuencia de aminoácidos inmunogénica de *L. intracellularis*. Las expresiones "proteína inmunogénica", "polipéptido inmunogénico" o "secuencia de aminoácidos inmunogénica", tal como se utiliza en la presente memoria, se refieren a cualquier secuencia de aminoácidos que provoca una respuesta inmunitaria en un hospedante contra un agente patógeno que comprende dicha proteína inmunogénica, polipéptido inmunogénico o secuencia de aminoácidos inmunogénica. En particular, una "proteína inmunogénica", "polipéptido inmunogénico" o "secuencia de aminoácidos inmunogénica" de *L. intracellularis* significa cualquier secuencia de aminoácidos que codifica un antígeno que provoca una respuesta inmunológica contra *L. intracellularis* en un anfitrión al que se administra dicha proteína inmunogénica, "polipéptido inmunogénico" o "secuencia de aminoácidos inmunogénica".

Una "proteína inmunogénica", "polipéptido inmunogénico" o "secuencia de aminoácidos inmunogénica", tal como se utiliza en la presente memoria, incluye pero no está limitada a ella, la secuencia de longitud completa de cualesquier proteínas, sus análogos, o sus fragmentos inmunogénicos. La terminología "fragmento inmunogénico" significa un fragmento de una proteína que incluye uno o más epítopos y así provoca la respuesta inmunológica contra el agente patógeno relevante. Tales fragmentos se pueden identificar utilizando cualquier número de técnicas de mapeo de epítopos que son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66 (Glenn E. Morris, Ed., 1996) Humana Press, Totowa, Nueva Jersey. Por ejemplo, los epítopos lineales pueden determinarse, por ejemplo, sintetizando concurrentemente grandes números de péptidos sobre soportes sólidos, correspondiendo los péptidos a porciones de la molécula de la proteína, y haciendo reaccionar los péptidos con anticuerpos, mientras los péptidos siguen estando fijados a los soportes. Técnicas de este tipo son conocidas en la técnica y se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 4.708.871; Geysen y col. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998-4002; y Geysen y col. (1986), Molec. Immunol., 23:709-715. De manera similar, los epítopos conformacionales se identifican fácilmente determinando la conformación espacial de aminoácidos tales como, por ejemplo, cristalografía de rayos x y resonancia magnética nuclear bidimensional. Véase, p. ej., Epitope Mapping Protocols, supra. También se incluyen dentro de la definición antígenos sintéticos, por ejemplo poliepítopos, epítopos flanqueantes y otros antígenos recombinantes u obtenidos de forma sintética. Véase, por ejemplo, Bergmann y col. (1993) Eur. J. Immunol. 23:2777-2781; Bergmann y col. (1996), J. Immunol., 157:3242-3249; Suhrbier, A. (1997), Immunol. and Cell Biol., 75: 402-408; y Gardner y col., (1998) 12th World AIDS Conference, Ginebra, Suiza, 28 de junio - 3 de julio, 1998.

Los antígenos de *L. intracellularis* adecuados incluyen, pero no se limitan a los descritos en los documentos EP 1219711; US 6.605.696; WO 96/39629; WO97/20050; WO 00/69903; WO 00/69904; WO 00/69905; WO 00/69906; WO 02/38594; WO 02/26250; WO 03/006665; WO 04/033631; WO 05/026200; y WO 05/011731.

Por tanto, la vacuna para uso incluye cualquier antígeno de *L. intracellularis* como los descritos anteriormente que provoque o que sea capaz de provocar una respuesta inmune contra *L. intracellularis*. Preferiblemente, dicha vacuna proporciona al menos protección aumentada contra *L. intracellularis*.

Se describe un método de vacunación de un animal joven contra infecciones de *L. intracellularis* que comprende la etapa de administrar a dicho animal joven en las tres primeras semanas de edad una dosis eficaz de antígeno de *L. intracellularis*, en donde el antígeno de *L. intracellularis* se selecciona del grupo que consiste en bacterias *L. intracellularis* vivas modificadas, bacterias *L. intracellularis* muertas o una o más subunidades de bacterias *L. intracellularis*. Preferiblemente la vacunación se produce entre el día 10 y el día 26 de edad, más preferiblemente entre el día 12 y el día 21 de edad, incluso más preferiblemente entre el día 15 y el día 21 de edad, y aún más preferiblemente entre el día 19 y el día 21 de edad. La vacunación se produce preferiblemente antes de los 26 días de edad, preferiblemente entre los 16 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 18 y los 24 días de edad, aún más preferiblemente entre los 19 y los 22 días de edad, y aún más preferiblemente a los 21 días de edad.

Preferiblemente, la vacuna comprende bacterias *L. intracellularis* vivas modificadas. Más preferiblemente, la vacuna es Enterisol® Ileitis B3903 (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.).

Se describe un método de vacunación de un animal joven, preferiblemente un cochinito joven, contra infecciones de *L. intracellularis* que comprenden la etapa de administrar a dicho animal joven comenzando entre los 10 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 12 y los 21 días de edad, incluso más preferiblemente entre los 15 y los 21 días de edad, y aún más preferiblemente entre los 19 y los 21 días de edad, o al animal joven antes de los 26 días de edad, preferiblemente entre los 16 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 18 y los 24 días de edad, aún más preferiblemente entre los 19 y los 22 días de edad, y más preferiblemente a los 21 días de edad, una dosis de aproximadamente 3,0 TCID₅₀ a aproximadamente 6,0 TCID₅₀ de bacterias *L. intracellularis* vivas modificadas. Preferiblemente, dichas bacterias son las incluidas en la vacuna Enterisol® Ileitis B3903 (Boehringer Ingelheim Vetmedica, Inc.).

Se describe un método de vacunación de un animal joven, preferiblemente un cochinito joven, contra infecciones de *L. intracellularis* que comprenden la etapa de administrar a dicho animal joven comenzando entre los 10 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 12 y los 21 días de edad, incluso más preferiblemente entre los 15 y los 21 días de edad, y aún más preferiblemente entre los 19 y los 21 días de edad, o al animal joven antes de los 26 días de edad, preferiblemente entre los 16 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 18 y los 24 días de edad, aún más preferiblemente entre los 19 y los 22 días de edad, y más preferiblemente a los 21 días de edad, una dosis eficaz de antígeno de *L. intracellularis*, en donde el animal joven es negativo en anticuerpos maternos *L. intracellularis* y anti-*L. intracellularis*.

Se describe un nuevo uso medicinal de una cantidad eficaz de antígeno de *L. intracellularis* para la preparación de un medicamento, preferiblemente una composición de vacuna, para la vacunación de un animal joven, preferiblemente un cochinito joven, entre los 10 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 12 y los 21 días de edad, incluso más preferiblemente entre los 15 y los 21 días de edad, y aún más preferiblemente entre los 19 y los 21 días de edad, o antes de los 26 días de edad, preferiblemente entre los 16 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 18 y los 24 días de edad, aún más preferiblemente entre los 19 y los 22 días de edad, y más preferiblemente a los 21 días de edad.

Se describe el uso medicinal descrito anteriormente, el antígeno de *L. intracellularis* se selecciona del grupo que consiste en una bacteria *L. intracellularis* viva modificada, una bacteria *L. intracellularis* muerta o una o más subunidades de la bacteria *L. intracellularis*. Preferiblemente, el antígeno de *L. intracellularis* es bacteria *L. intracellularis* viva modificada. Más preferiblemente, a dicho animal joven se le administra una dosis de aproximadamente 3,0 TCID₅₀ a aproximadamente 6,0 TCID₅₀ de bacterias *L. intracellularis* vivas modificadas. La fabricación de las composiciones de vacuna que comprenden un antígeno de *L. intracellularis* es convencional en el estado de la técnica y es conocida por el especialista en el campo. Por ejemplo, el experto en la técnica puede conocer componentes adicionales que pueden estar comprendidos en dicha composición (véase también Remington's Pharmaceutical Sciences, (1990), 18ª ed. Mack Publ., Easton). El experto puede utilizar disoluciones estériles inyectables conocidas, fisiológicamente aceptables. Para preparar una disolución lista para el uso como inyección o infusión parenteral, se encuentran disponibles fácilmente disoluciones isotónicas acuosas, tales como, por ejemplo, una disolución salina o las correspondientes disoluciones de proteínas en plasma. Las composiciones de vacunas pueden estar presentes en forma de liofilizados o preparaciones secas, las cuales se pueden reconstituir con una solución inyectable conocida, directamente antes del uso bajo condiciones estériles, p. ej. en forma de un kit de piezas.

Además, las composiciones inmunogénicas y de vacuna pueden incluir uno o más soportes aceptables desde el punto de vista veterinario. Tal como se emplea en esta memoria, "un soporte aceptable desde el punto de vista veterinario" incluye uno y cualesquiera disolventes, medios dispersantes, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizadores, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes que demoran la adsorción y similares.

Los "diluyentes" pueden incluir agua, disolución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina y sales alcalinas de ácido etilendiamintetracético, entre otros.

"Adyuvantes", tal como se utilizan en la presente memoria, pueden incluir hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, saponinas, por ejemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsión de agua en aceite, emulsión de aceite en agua o emulsión de agua en aceite en agua. La emulsión se puede basar, en particular, en aceite de parafina líquido ligero (del tipo de la Farmacopea Europea); aceite isoprenoide, tales como escalano o escaleno; aceite resultante de la oligomerización de alquenos, en particular de isobuteno o deceno; ésteres de ácidos o de alcoholes que contienen un grupo alquilo lineal, más particularmente aceites vegetales, oleato de etilo, di-(caprilato/caprato) de propilenglicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerilo o dioleato de propilenglicol; ésteres de ácidos grasos o alcoholes ramificados, en particular ésteres de ácido isosteárico. El aceite se utiliza en combinación con emulsionantes para formar la emulsión. Los emulsionantes son preferiblemente tensioactivos no iónicos, en particular ésteres de sorbitán, de manida (por ejemplo, oleato de anhidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenglicol y de ácido oleico, isosteárico, ricinoleico o hidroxisteárico, que están opcionalmente etoxilados, y copolímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno, en particular los productos Pluronic, en especial el L121. Véase Hunter y col., The Theory y Practical Application of Adjuvants (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley and Sons, NY, pág. 51-94 (1995), y Todd y col., Vaccine, 15: 564-570 (1997). Por ejemplo, es posible utilizar la emulsión SPT descrita en la página 147 de "Vaccine Design, The Subunit y Adjuvant Approach" editada por M. Powell y M. Newman, Plenum Press, 1995, y la emulsión MF59 descrita en la página 183 del mismo libro.

Un ejemplo adicional de adyuvante es un compuesto elegido entre los polímeros de ácido acrílico o metacrílico y los copolímeros de anhídrido maleico y derivado de alqueno. Los compuestos adyuvantes ventajosos son los polímeros del ácido acrílico o metacrílico que están reticulados, especialmente con poli(alquenoil éteres) de azúcares o polialcoholes. Estos compuestos se conocen por el término carbómero (Pharmeuropa Vol. 8, nº 2, junio 1996). Los expertos en la técnica también pueden referirse a la patente de EE.UU. Nº 2.909.462 que describe polímeros acrílicos de este tipo, reticulados con un compuesto polihidroxilado que tiene al menos 3 grupos hidroxilo, preferiblemente no

más de 8, estando los átomos de hidrógeno de al menos tres hidroxilos sustituidos por radicales alifáticos insaturados que tienen al menos 2 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 por sí mismos otros sustituyentes tal como metilo. Los productos vendidos bajo el nombre Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, EE.UU) son particularmente apropiados. Están reticulados con una alil-sacarosa o con alil-pentaeritritol. Entre ellos, se pueden mencionar Carbopol 974P, 934P y 971P. Lo más preferido es el uso de Cabopol 971P. Entre los copolímeros de anhídrido maleico y de derivado de alqueno, se encuentran los copolímeros EMA (Monsanto) que son copolímeros de anhídrido maleico y etileno. La disolución de estos polímeros en agua produce a una disolución ácida que será neutralizada, preferiblemente hasta un pH fisiológico, con el fin de obtener la disolución adyuvante en la que se incorporará la propia composición inmunogénica, inmunológica o de vacuna. Adyuvantes adecuados adicionales incluyen, pero no se limitan a ellos, el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), co-polímero de bloques (CytRx, Atlanta GA), SAF-M (Chiron, Emeryville CA), monofosforil- lípido A, adyuvante de lípido-amina Avridina, enterotoxina térmicamente lábil procedente de *E. coli* (recombinante o de otra forma), toxina de cólera, IMS 1314, o dipéptido de muramilo, entre muchos otros.

Preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 10 mg por dosis. Incluso más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 100 µg hasta aproximadamente 10 mg por dosis. Incluso más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 500 µg hasta aproximadamente 5 mg por dosis. Incluso más preferiblemente, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 750 µg hasta aproximadamente 2,5 mg por dosis. Lo más preferible, el adyuvante se añade en una cantidad de aproximadamente 1 mg por dosis.

La composición de vacuna puede además incluir uno o más de otros agentes inmunomoduladores tales como por ejemplo, interleucinas, interferones u otras citocinas. Las composiciones de vacuna pueden también incluir Gentamicina y Mertiolo. Si bien las cantidades y concentraciones de los adyuvantes y aditivos útiles pueden ser determinadas fácilmente por el experto en la técnica, las composiciones preferiblemente comprenden entre aproximadamente 50 µg y aproximadamente 2.000 µg de adyuvante y preferiblemente aproximadamente 250 µg/mL de dosis de la composición de vacuna. Preferiblemente, las composiciones de vacuna comprenden de aproximadamente 1 µg/mL a aproximadamente 60 µg/mL de antibióticos, y más preferiblemente menos de aproximadamente 30 µg/mL de antibióticos.

La vacuna se administra a animales, preferiblemente a mamíferos, y aún más preferiblemente a cerdos, en cualquier modo convencional, más preferiblemente mediante un empapado oral. La dosificación que se va a administrar dependerá del caso particular, pero en cualquier caso, es la cantidad suficiente para inducir un anticuerpo protector o respuesta inmunitaria mediada por la célula contra la ileítis.

Preferiblemente, las vacunas de *L. intracellularis* usadas para la vacunación de los animales jóvenes (preferiblemente los cochinitos jóvenes) se administran en una o en repetidas dosis. La vacuna viva o muerta puede administrarse 1 ó 2 veces en intervalos de 2 a 4 semanas después de la vacunación inicial. Para las vacunas vivas atenuadas se prefiere una dosis. Preferiblemente, la primera o única administración se lleva a cabo entre los 16 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 18 y los 24 días de edad, incluso más preferiblemente entre los 19 y los 22 días de edad, y aún más preferiblemente a los 21 días de edad, tal como se ha descrito anteriormente, o comenzando entre los 10 y los 26 días de edad, más preferiblemente entre los 12 y los 21 días de edad, incluso más preferiblemente entre los 15 y los 21 días de edad, y aún más preferiblemente entre los 19 y los 21 días de edad.

Si es deseable o necesaria una segunda administración, la segunda administración se lleva a cabo de aproximadamente 1 a aproximadamente 4 semanas después de la primera administración de la vacuna. Preferiblemente, la revacunación se realiza en un intervalo de 3 a 12 meses después de la administración de cualquier vacunación previa. La administración de las dosis subsiguientes de la vacuna preferiblemente se realiza según una base semestral o anual.

Ejemplos

Los siguientes son ejemplos representativos de realizaciones preferidas de la presente invención. Debe entenderse que nada de lo presentado debería ser considerado como una limitación del alcance global de la invención.

Ejemplo 1

Este ejemplo evaluó la eficacia de una vacuna de *Lawsonia* en cochinitos de tres semanas de edad nacidos de cerdas vacunadas contra *Lawsonia* y de cerdas no vacunadas, y determinó si la vacunación de las cerdas indujo interferencias inmunológicas maternas que impedirían una respuesta a la vacunación del cochinito, medido como una reducción de la inducción de la enfermedad después de una exposición a cultivo virulento puro de los cochinitos vacunados y no vacunados. Los parámetros primarios de estudio usados para medir la eficacia fueron las lesiones macroscópicas y microscópicas del íleo y del colon. Adicionalmente, este ejemplo evaluó la vacuna de *Lawsonia* en episodios de seguridad cuando se administra a cerdas preñadas durante la segunda y tercera etapas de la gestación tras administración de dosis sencilla y repetida.

Materiales y Métodos

- En un estudio a ciegas, se tomaron dieciséis cerdas sero-negativas de *Lawsonia* saludables y preñadas, y fueron divididas aleatoriamente en 2 grupos, cada uno de ellos con 8 cerdas. El grupo A recibió 3 dosis de Enterisol Ileitis B3903 por mojado oral en los días -55, -35 y -14, con la intención de inducir un alto nivel de inmunidad materna antes del parto. Las cerdas del grupo B recibieron un placebo antes del parto y sirvieron a modo de control negativo. Al principio a las cerdas se las alimentó con una ración de gestación comercial no medicada, antes de cambiar a una dieta lactante no medicada. Se realizaron esfuerzos para obtener concepciones y partos uniformes para todas las cerdas, pero aún así existió algo de variación (10 días) en la fecha del parto. Con el fin de evitar los problemas de variabilidad asociados a tener múltiples días de vacunación y de exposición, se estableció la media de las fechas de parto como día 0 del ensayo. Todos los cochinitos usados en la porción de vacuna y de exposición del estudio tenían 21 ± 5 días de edad en el momento de la vacunación (Día 21). Al principio los cochinitos fueron alimentados con una ración de inicio no medicada, seguida de una ración de cría no medicada, seguida de una ración finalización del crecimiento no medicada. Las muestras de serología tomadas de los cerdos se recogieron el mismo día del nacimiento, a los 7 días de edad y a los 14 días de edad, para asegurar una medida precisa de los anticuerpos maternos, en caso de que hubiera. Antes del parto se tomó la serología de las cerdas. Adicionalmente, las cerdas fueron sacrificadas en la jornada 22, sus tejidos de colon y de íleo fueron evaluados para determinar patologías graves, su íleo, colon, nodos linfáticos mesentéricos y amígdalas fueron evaluados mediante PCR, los cerdos nacidos muertos fueron evaluados mediante PCR, y se evaluó la capacidad reproductiva de camada de las cerdas se evaluó registrando los cerdos como recién nacidos, nacidos muertos o momias el día del parto.
- Después del parto (en el día 21 del estudio), se bloquearon 100 cochinitos sanos por camada y a continuación fueron asignados a uno de los seis grupos de tratamiento, cada uno de ellos alojado por separado a lo largo de todo el estudio. Los cochinitos procedentes de cerdas vacunadas (Grupo A) fueron asignados aleatoriamente a los grupos de tratamiento 1-3. Los cochinitos procedentes de cerdas no vacunadas (Grupo B) fueron asignados aleatoriamente a los grupos de tratamiento 4-6. En la jornada 21, los grupos de tratamiento 1 y 4, con 20 cochinitos cada uno, recibieron una dosis de 2 mL ($1 \times 10^{5.0} \log_{10}$ TCID₅₀/dosis) de vacuna de Enterisol Ileitis B3903 por mojado oral directo. Los grupos de tratamiento 2 y 5, cada uno de ellos con 20 cochinitos, recibieron una dosis de 2 mL de placebo por mojado oral directo. Los grupos de tratamiento 3 y 6, con 10 cochinitos por grupo, no recibieron tratamiento alguno y sirvieron como controles estrictos para validar la susceptibilidad del origen del cerdo a la infección de *Lawsonia*.
- Tres semanas después de la vacunación (día 42 del estudio), los cochinitos del ensayo de los grupos de tratamiento 1, 2, 4 y 5 fueron expuestos mediante la administración de una dosis de 10 mL ($1 \times 10^{7.3} \log_{10}$ TCID₅₀/dosis) de cultivo puro virulento de bajo pasaje del elemento aislado heterólogo N101494 de *Lawsonia*, mediante saturación gástrica. Sin embargo, se pueden utilizar otros elementos aislados de *L. intracellularis* naturales infecciosos o de bajo pasaje como bacterias de exposición. En la jornada 63 del estudio (tres semanas después de la exposición), todos los grupos de tratamiento (1-6) fueron sometidos a eutanasia y sacrificados para realizar un análisis de lesiones macro y microscópicas de la PPE.
- El criterio principal usado para determinar la eficacia de la vacuna de Enterisol Ileitis B3903 en cochinitos contra la exposición a cultivo puro virulento heterólogo fue la observación del desarrollo de lesiones usando tanto técnicas macroscópicas como microscópicas para evaluar las lesiones del íleo y del colon. Las lesiones macroscópicas se evaluaron en secciones del íleo, en la unión ileal-cecal y en el colon en el momento de finalización del estudio. Las lesiones intestinales fueron clasificadas en grados según el nivel de gravedad, y se tomaron muestras adicionales de la zona infectada del tejido para realizar análisis PCR, IHC y H&E. La gravedad de las lesiones se determinó a través del grado de espesamiento mucosal encontrado en el recubrimiento mucosal del íleo. Una puntuación de lesión de 0 indicó que no había evidencia de espesamiento mucosal edema pliegues o fisuras de mucosa, o prominencia de reticulación serosal. Una puntuación de lesión de 1 indicó un espesamiento suave que incluye la presencia de pequeños pliegues/grietas en la mucosa, edema suave de la pared mucosal y en algunos casos hiperemia. Una puntuación de lesión de 2 se atribuyó a un espesamiento y/o inflamación moderados. Quedó en evidencia a través de pliegues/grietas profundos en la mucosa, edemas moderados de la pared mucosal, reticulación de las superficies serosales y, en algunos casos, hiperemia. Una puntuación de lesión de 3 indicó un espesamiento y/o inflamación grave, evidenciado por pliegues/grietas profundos en la mucosa, edemas moderados de la pared mucosal, reticulación de las superficies serosales y, de nuevo en algunos casos, hiperemia. Una puntuación de lesión de 4 indicó un espesamiento y/o inflamación grave y/o presencia de sangre. Dicha puntuación de lesión quedó evidenciada por pliegues/grietas graves y profundos en la mucosa, por edemas moderados en la pared mucosal, reticulación de las superficies serosales, de nuevo en algunos casos hiperemia, y por la presencia de contenidos sanguíneos y/o de coágulos de sangre. Finalmente, una puntuación de lesión de 5 indicó necrosis evidenciada por lesiones graves de la superficie mucosal tales como presencia de necrosis, o en algunos casos que toda la superficie mucosal esté mudada o separada debido a la gravedad de la lesión.
- Lesiones microscópicas causadas por *Lawsonia* son patognómicas para la PPE. Las lesiones histopatológicas de la enfermedad incluyen la hiperplasia epitelial, especialmente en las criptas mucosales con una distinta ausencia de células copa. Normalmente, la *Lawsonia* se encuentra en las células epiteliales proliferativas de la cripta mucosal. Se colocaron secciones de íleo de aproximadamente 2-4 cm de longitud en formalina tamponada para el examen histológico usando los métodos de tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E) y de IHC. Las tinciones de H&E detectan

la presencia hiperplasia de cripta provocada por la infección de *Lawsonia* mientras que las tinciones de IHC explotan la especificidad de un anticuerpo monoclonal anti-*Lawsonia* al confirmar la presencia del organismo y del desarrollo de lesiones microscópicas en los tejidos afectados. El anticuerpo monoclonal anti-*Lawsonia* detecta específicamente la célula completa de *Lawsonia* apuntando a la proteína de membrana exterior de todos los elementos aislados de *Lawsonia*. Este anticuerpo monoclonal fue derivado a partir de la línea celular de hibridoma VPM53, desarrollada por investigadores de la Universidad de Edimburgo, Escocia. La presencia de organismos de *Lawsonia* y de gravedad de lesión microscópica determinada mediante tinción IHC de secciones ileales su puntuó con una puntuación de 0, que indica que no había enterocitos proliferativos (lesiones), con una puntuación de 1, que indica lesiones focales moderadas, con una puntuación de 2, que indica lesiones difusas moderadas, y con una puntuación de 3, que indica lesiones difusas graves. Con respecto a la presencia de organismos, el sistema de puntuación IHC determinó la presencia de ningún organismo como 0, la presencia de pocos organismos focales como 1, la presencia de organismos difusos moderados como 2, y la presencia de organismos difusos graves como 3.

Los criterios secundarios de medidas fueron la observación de síntomas clínicos, la detección de *Lawsonia* en muestras fecales y tejidos mediante PCR, el ADWG y la seroconversión (IFAT) debido a la exposición de cochinitos a *Lawsonia*.

Se realizó una vigilancia diaria de la salud desde la fecha del inicio del estudio hasta el día de la exposición para animal ensayado. Los parámetros de salud clínica, que incluyen la diarrea, el comportamiento y la condición corporal, fueron evaluados diariamente desde el día de la exposición (día 42) hasta el día anterior a la finalización (día 62). La puntuación reflejó la gravedad de la enfermedad. Para la diarrea, una puntuación de 1 indicó heces normales, una puntuación de 2 indicó heces semisólidas sin sangre, una puntuación de 3 indicó heces acuosas pero sin ninguna sangre o heces oscuras, y una puntuación de 4 indicó heces teñidas con sangre, independientemente de que estuvieran sueltas o formadas. Una puntuación de comportamiento de 1 indicó un comportamiento normal, una puntuación de 2 indicó un comportamiento deprimido de ligero a moderado (se mantiene aislado), y una puntuación de 3 indicó un comportamiento yacente o gravemente deprimido. Una puntuación corporal de 1 indicó una condición corporal normal, una puntuación de 2 indicó una condición corporal de ligera a moderadamente demacrada, y una puntuación de 3 indicó una condición gravemente demacrada.

Se evaluó el derrame fecal de *Lawsonia* mediante PCR de ileítis evaluando muestras fecales (f-PCR) en los días -55, -35, -14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 63 del estudio. Las muestras fecales fueron analizadas para determinar la presencia de ADN de *Lawsonia* en heces usando PCR. Se tomaron secciones de tejido fresco de cada animal evaluado a la finalización del estudio, en la jornada 63. Se evaluó el análisis cualitativo del contenido de bacterias en los tejidos mediante PCR de ileítis (t-PCR) junto con una evaluación histológica para determinar *Lawsonia* en el íleo, colon, amígdalas y nodos linfáticos mesentéricos en el día 63 del estudio. El ensayo de PCR fue desarrollado por Jones, y col., y explota la especificidad de dos cebadores de oligonucleótidos (de 20 pares base cada uno) para producir un fragmento de 319 pb a partir de ADN genómico de *Lawsonia*. Estos cebadores están dirigidos a una secuencia previamente determinada de ADN genómico específico de *Lawsonia*. Los fragmentos de ADN producidos durante la PCR se comparan con controles de reacción de PCR y de extracción de ADN negativos y positivos en ileítis para confirmar un resultado "positivo" o "no positivo". El control de extracción de ADN positivo es célula entera de *Lawsonia* con células McCoy infectadas en 1X Disolución Salina Tamponada de Fosfato (PBS) (200µL/tubo). El control de extracción de ADN negativo es células McCoy no infectadas en 1X PBS (200µL/tubo). Los controles de reacción PCR de ileítis consisten en ADN genómico de *Lawsonia* purificado a partir de material recolectado de un cultivo celular (células *Lawsonia* + McCoy), mientras que el control negativo es agua libre de ARNasa (Amresco, Solon, Ohio). Un muestra de ensayo positiva en ADN de *Lawsonia* producirá el fragmento de ADN de tamaño idéntico (319 pb) al de ambos controles positivos de PCR de ileítis (extracción y reacción), mientras que las muestras negativas no producirán un fragmento de dicho tamaño. Las preparaciones de ADN extraído de cada muestra de ensayo fueron obtenidas usando kits de extracción de ADN ISO-QUICK (ORCA Research, Inc., Bothell, Washington). Los resultados de PCR se usaron para determinar las deposiciones de *Lawsonia* en cochinitos vacunados con Enterisol Ileitis B3903 y/o expuestos al elemento aislado heterólogo de *Lawsonia* N101494.

Se midieron los pesos el día de la vacunación (día 21), el día de la exposición (día 42) y el día de finalización del estudio (día 63) con el fin de calcular la ganancia media de peso diaria (ADWG, en sus siglas en inglés) de cada grupo de tratamiento. Se compararon las ADWG de todos los grupos para determinar la ADWG post-vacunación y post-exposición. Los pesos corporales se determinaron usando un sistema electrónico de escala de barra de peso (Weigh-Tronix, Weigh-Tronix, Inc., Fairmont, Minnesota) calibrado usando pesos certificados de ensayo antes y después de cada uso.

Se evaluó el suero usando el Ensayo de Anticuerpo Fluorescente Indirecto (IFAT en sus siglas en inglés) para detectar anticuerpos anti-*Lawsonia* en animales de ensayo. Se tomó sangre entera venosa en tubos de las cerdas en los días -55, -35 y -14 y de todos los animales a los 0, 7 y 14 días de edad, y en los días de ensayo 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 63 del estudio. Se dejó que la sangre coagulara antes de ser centrifugada, y se recolectó y congeló el suero. A continuación el IFAT escrutó el suero de cerdo para determinar la presencia de moléculas IgG anti-*Lawsonia*. Los anticuerpos anti-*Lawsonia* se unen a antígenos de la membrana exterior de la célula entera de *Lawsonia*, cubriendo completamente el organismo que está fijado al fondo de cada pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se introdujo conjugado de anticuerpo secundario anti-IgG marcado con FITC para unirse a cualesquier complejos IgG-antígeno de cada pocillo. Estos complejos ligados a FITC se iluminan en verde fluorescente bajo luz ultravioleta.

Una muestra de ensayo positiva revela muchas varas pequeñas de forma curva, de color verde brillante, que se asemejan a *Lawsonia*, o a células McCoy infectadas que contienen numerosas *Lawsonia*. Un muestra de ensayo negativa en IFAT muestra un fondo verde apagado (tenue) de células McCoy. Los resultados obtenidos mediante IFAT fueron usados para observar un modelo de seroconversión en grupos que reciben una vacunación y/o una exposición virulenta indicativa de presencia de *Lawsonia* en el animal.

En ensayo de punto final de TCID₅₀ se llevó a cabo sobre muestras representativas de cada dosis de vacuna administrada a los cochinitos de ensayo el día 21 del estudio. Se diluyeron cinco réplicas de muestras de ensayo representativas en una proporción de 10 a 1 (de 10⁻¹ a 10⁻⁶) antes y después de la vacunación y de la administración de exposición en Medio Esencial Modificado de Dulbecco reforzado con Ham's F12 (DMEM F12, de sus siglas en inglés) y con un 5% de Suero Bovino de Neonato (NBS en sus siglas en inglés) activado térmicamente (JRH Biosciences, Lenexa, Kansas). Se evaluaron muestras diluidas para determinar la cantidad de *Lawsonia* vivas en cada muestra de ensayo. Se calcularon títulos medios a partir de 5 réplicas antes y después de la administración de exposición, y se multiplicaron por el volumen de material de ensayo proporcionado a cada cochinito para determinar el total de log₁₀ de *Lawsonia* por dosis. Los títulos medios totales (log₁₀ TCID₅₀/dosis) para vacunación o exposición se determinaron a partir de los resultados de valoración de antes y de después (2 títulos).

Las comparaciones de grupos de tratamiento se realizaron analizando los datos de ADWG, tanto después de la vacunación como después de la exposición, las puntuaciones clínicas, las tasas de seroconversión (IFAT), la colonización (t-PCR), la pérdida fecal (f-PCR), el desarrollo de lesiones macroscópicas, y el de lesiones microscópicas mediante inmunohistoquímica (IHC).

Tres cochinitos murieron después de la vacunación (uno del Grupo 1 y dos del Grupo 5), pero antes de la finalización del estudio. El cochinito del Grupo 1 fue analizado para determinar la presencia de infección de *Lawsonia*, pero se determinó que la causa de muerte fue choque/septicemia debida a altos niveles de *E.coli*. Los dos cochinitos del Grupo 5 que murieron presentaron las lesiones macroscópicas y microscópicas típicas de la infección de *Lawsonia* y la causa presumible de muerte fue debida a la *Lawsonia*.

Resultados

La evaluación de muestras fecales y de suero recogidas en este estudio indicó que ninguna cerda del Grupo A o del Grupo B presentaba *Lawsonia* detectable en sus heces o en el íleo o el colon. Las cerdas del Grupo A tenían de 5 a 8 animales con títulos IFAT detectables en al menos un punto temporal del estudio. Ninguna cerda del Grupo B presentó un título IFAT detectable durante el mismo periodo de tiempo. Estos datos se presentan a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1: Datos de cerdas

Tratamiento de la cerda	Lesiones Macroscópicas del íleo	Lesiones Macroscópicas del colon	PCR de Tejido (Íleo/Colon/MLN/Amígdala)	IFA	Media de cerdos nacidos vivos/camada
A – Vacunada	0/8	0/8	0/8	5/8	9,4
B – No vacunada	0/8	0/8	0/8	0/8	7,6

Todas las cerdas fueron sacrificadas y evaluadas para determinar la presencia de lesiones macroscópicas típicas de la infección de *Lawsonia*. Sin embargo, ninguna cerda presentó lesiones macroscópicas o dio positivo en la detección de t-PCR.

A pesar del hecho de que la vacuna se administró durante el 2º y el 3º trimestres del embarazo, no se registraron observaciones de salud general anormales para ninguna cerda durante el ensayo clínico. Los resultados del parto entre las cerdas del Grupo A y del Grupo B también fueron muy similares, con una media de 9,6 y 7,6 cochinitos nacidos vivos en cada grupo, respectivamente. Las cerdas del Grupo A tenían una media de 1,8 cerdos nacidos muertos por camada, y ninguna momia o mortalidad en el parto. Las cerdas del Grupo B presentaron una media de 0,9 mortinatos, 0,1 momias y 0,1 cerdos muertos durante el parto, por camada. La evaluación diagnóstica de dichos cerdos mortinatos indicó que eran negativos en *Lawsonia* y que se encontraban dentro de las pérdidas normales asociadas a la reproducción. Los resultados de serología fueron como se esperaba en tanto que las cerdas no vacunadas permanecieron seronegativas y en el Grupo A se detectaron algunos animales seropositivos. Las cerdas del Grupo A tenían mayores valores de cerdos/camada en comparación con los controles no vacunados. El resultado indica que no había ningún efecto negativo debido a los métodos o al contenido de la vacunación. Estos datos se resumen en la anterior Tabla 1.

El desarrollo de lesiones macroscópicas en cochinitos se determinó evaluando y puntuando el íleo y el colon de cada animal ensayado para determinar lesiones macroscópicas asociadas a PPE en el momento de la finalización del

estudio. Los cochinitos de los Grupos 1 y 4 presentaron las menores puntuaciones de íleo con un 0,16 y un 0,15, respectivamente. Estos valores no fueron significativamente diferentes y demostraron la eficacia de la vacuna en cerdos procedentes tanto de cerdas vacunadas como no vacunadas. Los Grupos 2 y 5 presentaron puntuación de lesiones de íleo de 0,85 y de 2,35, respectivamente. Estos valores fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$) e indicaron que la vacunación de las cerdas proporciona un cierto nivel de protección materna (Grupo 2) y que los animales recién nacidos eran sensibles a la exposición virulenta (Grupo 5). Los Grupos 4 y 5 también presentaron puntuaciones de íleo significativamente diferentes ($P < 0,05$) y confirmaron la eficacia de la vacuna en los cochinitos recién nacidos vacunados. Las puntuaciones de íleo de los Grupos 1 y 2 también fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$) y confirman que la vacunación de cerdos procedentes de cerdas positivas en *Lawsonia* proporciona un beneficio significativo ($P < 0,05$) más allá de la inmunidad materna. Se obtuvieron las mismas tendencias y significancias con las muestras de íleos en términos de porcentaje de animales positivos (positivos/total del grupo). Se descubrieron lesiones de íleo en el 80% de los cerdos del Grupo 5. Por el contrario, menos del 16% de los animales de los Grupos 1 y 4 presentaron lesiones de íleo.

Con respecto a las puntuaciones de lesiones macroscópicas del colon y al porcentaje de animales positivos, se produjo una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre el Grupo 4 y el Grupo 5. No se produjeron otras diferencias significativas entre los grupos de tratamiento. Los controles estrictos (Grupos 3 y 6) fueron negativos en cuanto a lesiones macroscópicas del íleo y del colon, confirmando con ello la validez del estudio. Los resultados de este ensayo se proporcionan en la Tabla 2 que figura a continuación:

Tabla 2: Resumen de las puntuaciones de lesiones macroscópicas en cerdos de los diferentes grupos de tratamiento

Grupo	Grupo de tratamiento	Íleo (Pos/Total Grupo)	Puntuación Macroscópica de Íleo	Colon (Pos/Total Grupo)	Puntuación Macroscópica de Colon
1	Cerda A – Cerdo vacunado	3/19 ^b	0,16 ^b	2/19	0,26
2	Cerda A – Cerdo placebo	9/20 ^{b,d}	0,85 ^{b,d}	4/20	0,45
3	Cerda A – Control Estricto	0/10 ^f	0,00 ^f	0/10 ^f	0,00 ^f
4	Cerda B – Cerdo vacunado	3/20 ^e	0,15 ^e	1/20 ^e	0,05 ^e
5	Cerda B – Cerdo placebo	16/20 ^{d,e}	2,35 ^{d,e}	6/20 ^e	0,80 ^e
6	Cerda B – Control Estricto	0/10 ^f	0,00 ^f	0/10 ^f	0,00 ^f

^b La comparación entre el Grupo 1 y el 2 es significativamente ($P < 0,05$) diferente.

^c La comparación entre el Grupo 1 y el 4 es significativamente ($P < 0,05$) diferente.

^d La comparación entre el Grupo 2 y el 5 es significativamente ($P < 0,05$) diferente.

^e La comparación entre el Grupo 4 y el 5 es significativamente ($P < 0,05$) diferente.

^f Grupo no incluido en los análisis estadísticos tal como se indica en el protocolo.

Se usaron métodos IHC y H&E para evaluar el desarrollo de lesiones microscópicas en cochinitos. Se tomaron secciones de 2-4 cm de longitud de amígdala, nodo linfático mesentérico, íleo terminal y colon a la finalización del estudio (día 63), y fueron colocadas en formalina tamponada al 10% para el análisis IHC. No se detectó *Lawsonia* mediante tinción IHC de las secciones de amígdalas en ninguno de los grupos de tratamiento a la finalización del estudio. Se detectó *Lawsonia* en 2/20 de las muestras de nodo linfático mesentérico del Grupo 5. Todas las demás muestras de nodos linfáticos mesentéricos de todos los grupos fueron negativas y no se observó ninguna diferencia significativa entre los grupos de tratamiento en relación al ensayo de nodo linfático mesentérico.

Los Grupos 1 y 4 presentaron puntuaciones de íleo microscópicas de 0,35 y de 0,15, respectivamente, y no fueron significativamente diferentes. El Grupo 5 presentó la mayor puntuación de íleo microscópica con 2,42 y fue significativamente diferente ($P < 0,05$) a las de los grupos de tratamiento 2 y 4. Esto demuestra que existe un cierto grado de inmunidad materna en el Grupo 2 y que la vacuna proporciona eficacia en los cerdos recién nacidos vacunados. La evaluación del porcentaje de muestras de íleo con lesiones microscópicas indicó que el 95% de los cerdos del Grupo 5 presentaba lesiones y que dicho grupo es de nuevo significativamente ($P < 0,05$) diferente de los Grupos 2 y 4. El Grupo 5 presentó una puntuación media de colon microscópica del 1,35%, y el 60% de los animales

de este grupo de tratamiento fueron positivos en la detección de lesión debido a *Lawsonia*. Este valor fue significativamente ($P < 0.05$) mayor que los de los grupos de tratamiento 2 y 4. Los datos macroscópicos se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Resumen de las lesiones microscópicas en tejidos de cerdos a la finalización del estudio

Grupo	Grupo de tratamiento	Puntuación Media de Lesión de ÍLEO Microscópica (IHC)	ÍLEO (Gravedad) Cerdos Positivos por IHC en Microlesiones/Total Grupo	Puntuación Media de Lesión de COLON Microscópica (IHC)	COLON (Gravedad) Cerdos Positivos por IHC en Microlesiones/Total Grupo
1	Cerda A – Cerdo vacunado	0,35	3/20	0,15	2/20
2	Cerda A – Cerdo placebo	0,70 ^d	6/20 ^d	0,55 ^d	5/20 ^d
3	Cerda A – Control Estricto	0,00 ^f	0/10 ^f	0,00 ^f	0/10 ^f
4	Cerda B – Cerdo vacunado	0,15 ^e	2/20 ^e	0,05 ^e	1/20 ^e
5	Cerda B – Cerdo placebo	2,42 ^{d,e}	18/19 ^{d,e,*}	1,35 ^{d,e}	12/20 ^{d,e}
6	Cerda B – Control Estricto	0,20 ^f	1/10 ^f	0,00 ^f	0/10 ^f

5 ^d La comparación entre el Grupo 2 y el 5 es significativamente ($P < 0,05$) diferente.

^e La comparación entre el Grupo 4 y el 5 es significativamente ($P < 0,05$) diferente.

^f Grupo no incluido en los análisis estadísticos tal como se indica en el protocolo.

* 1 muestra presentó necrosis y caída de tejido severa y no pudo leerse mediante IHC.

10 Con el fin de evaluar la eliminación fecal de *Lawsonia* en los cochinitos mediante f-PCR, se tomaron muestras fecales semanalmente de todos los animales de ensayo de cada grupo de tratamiento y se evaluó la presencia de *L. intracellularis* mediante PCR de ileítis en los días 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 63 del estudio. En los días 21, 28 y 35, los cochinitos de todos los grupos de tratamiento dieron negativo para *L. intracellularis* en las pruebas de f-PCR. Los cochinitos del Grupo 1 fueron detectados como positivos mediante f-PCR en el día 42, y permanecieron positivos hasta el día 63, con un 11-16% de los cochinitos dando positivo durante este periodo de tiempo. Los cochinitos del Grupo 2 fueron detectados como positivos mediante f-PCR en el día 49, y permanecieron positivos hasta el día 63, con un 5-25% de los cochinitos dando positivo durante este periodo de tiempo. Los cochinitos del Grupo 4 fueron detectados como positivos mediante f-PCR en el día 42, y permanecieron positivos hasta el día 63, con un 5-25% de los cochinitos dando positivo durante este periodo de tiempo, respectivamente. Los cochinitos del Grupo 5 fueron detectados como positivos mediante f-PCR en el día 49, y permanecieron positivos hasta el día 63, con un 15-72% de los cochinitos dando positivo durante este periodo de tiempo. Los cochinitos del Grupo 3 y del 6 permanecieron negativos por f-PCR durante todo el experimento. El análisis de chi-cuadrado de los datos indica una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los grupos 4 y 5 en el día 42, entre los grupos 2 y 5 en el día 63, y entre los grupos 4 y 5 en el día 63. Los datos de eliminación fecal se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4: Resumen de la eliminación fecal de *L. intracellularis* entre los grupos de tratamiento de cerdos

	Grupos					
	1	2	3	4	5	6
Grupo de tratamiento	Cerda A – Cerdo vacunado	Cerda A – Cerdo placebo	Cerda A – Control Estricto	Cerda B – Cerdo vacunado	Cerda B – Cerdo placebo	Cerda B – Control Estricto
Día 21	0/20 ^a	0/20 ^a	0/10 ^f	0/20 ^a	0/20 ^a	0/10 ^f
Día 28	0/20 ^a	0/20 ^a	0/10 ^f	0/20 ^a	0/20 ^a	0/10 ^f

Día 35	0/20 ^a	0/20 ^a	0/10 ^f	0/20 ^f	0/20 ^a	0/10 ^f
Día 42	3/20	0/20	0/10 ^f	5/20 ^e	0/20 ^e	0/10 ^f
Día 49	2/19 ^a	1/20 ^a	0/10 ^f	2/20 ^a	3/20 ^a	0/10 ^f
Día 56	2/19 ^a	3/20 ^a	0/10 ^f	1/20 ^e	8/19 ^e	0/10 ^f
Día 63	3/19	5/20 ^d	0/10 ^f	2/20 ^e	13/18 ^{d,e}	0/10 ^f

^a La comparación global **no** es significativamente diferente por el ensayo Chi-cuadrado.

^d La comparación de los Grupos 2 y 5 es significativamente (P<0,05) diferente por el ensayo de Chi-cuadrado.

^d La comparación de los Grupos 4 y 5 es significativamente (P<0,05) diferente por el ensayo de Chi-cuadrado.

^f Grupo no incluido en los análisis estadísticos tal como se indica en el protocolo.

5 La colonización de tejidos por *Lawsonia* (t-PCR) en cerdos se evaluó a la finalización del estudio (día 63) mediante ensayo PCR de las secciones de tejido del íleo terminal, del colon, de las amígdalas y del nodo linfático mesentérico. Los controles estrictos (Grupos 3 y 6) fueron negativos en t-PCR para la detección de *Lawsonia*, confirmando con ello la validez de la fuente de cerdos y del estudio. Todas las muestras de amígdala fueron negativas por t-PCR. Únicamente las muestras de colon y de nodo linfático mesentérico del Grupo 5 dieron positivo, siendo positivos un 5-10% de los cochinitos. Las muestras de íleo de cochinitos del Grupo 1 y del 2 presentaron un 20% y un 25% de resultados de ensayo positivos mediante t-PCR, respectivamente. En comparación, los cochinitos del Grupo 4 y del 5 presentaron un 5% y un 45% de resultados de ensayo positivos mediante t-PCR, respectivamente. Todas las muestras de íleos de los Grupos 3 y 6 fueron negativas en el ensayo de t-PCR. El análisis de Chi-cuadrado no indicó diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en las muestras de amígdala, nodo linfático mesentérico o colon. No hubo una diferencia significativa (P<0,05) entre los Grupos 4 y 5 en los resultados de t-PCR del íleo, presentando el Grupo 5 el mayor porcentaje de positivos del experimento. Los datos de este ensayo se resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de colonización de tejidos por *L. intracellularis* entre los grupos de tratamiento de cerdos (positivos/total grupo)

Grupo	Grupo de tratamiento	Amígdala positivo en t-PCR	Nodo Linfático Mesentérico positivo en t-PCR	Íleo positivo en t-PCR	Colon positivo en t-PCR
1	Cerda A – Cerdo vacunado	0/20 ^a	0/20 ^a	4/20	0/20 ^a
2	Cerda A – Cerdo placebo	0/20 ^a	0/20 ^a	5/20	0/20 ^a
3	Cerda A – Control Estricto	0/10 ^f	0/10 ^f	0/10 ^f	0/10 ^f
4	Cerda B – Cerdo vacunado	0/20 ^a	0/20 ^a	1/20 ^e	0/20 ^a
5	Cerda B – Cerdo placebo	0/20 ^a	2/20 ^a	9/20 ^e	1/20 ^a
6	Cerda B – Control Estricto	0/10 ^f	0/10 ^f	0/10 ^f	0/10 ^f

20 ^a La comparación global **no** es significativamente diferente por el ensayo Chi-cuadrado.

^d La comparación de los Grupos 4 y 5 es significativamente (P<0,05) diferente por el ensayo de Chi-cuadrado.

^f Grupo no incluido en los análisis estadísticos tal como se indica en el protocolo.

25 Se calculó la ADWG desde el tiempo de vacunación (día 21), hasta la administración de la exposición (día 42), hasta la finalización del estudio (día 63) y entre la exposición (día 42) y la finalización del estudio (día 63). El día de la vacunación (día 21), no había ninguna diferencia significativa entre los grupos de tratamiento. De forma similar, no hubo diferencias significativas después de la vacunación desde el día 21 hasta el día 42. Dichos resultados confirman que la vacuna es segura y no afecta al desarrollo medido a través de la ganancia de peso. Después de la

exposición virulenta, no se produjeron diferencias significativas ($P < 0,05$) en la ADWG entre los Grupos 1 y 4, entre los Grupos 2 y 5, y entre los Grupos 4 y 5. El Grupo 5 presentó la menor ADWG del estudio con un valor de 0,399 Kg/día. La evaluación de Chi-cuadrado del periodo de tiempo que va desde la vacunación hasta la exposición y hasta el momento de finalización del estudio también indicó que había una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los Grupos 1 y 4 y entre los Grupos 4 y 5. Estos datos se resumen a continuación en la Tabla 6.

5

Tabla 6: Resumen de las ganancias de peso medias diarias (ADWG) de los cerdos

Grupo	Grupo de tratamiento	Peso Inicial Medio (Kg) el día 21	Ganancia media de peso diaria (días 21-42) (Kg) Vacunación	Ganancia media de peso diaria (días 42-63) (Kg) Exposición	ADWG Total (día 21 a día 63) (Kg) Desde la Vacunación hasta la Exposición
1	Cerda A – Cerdo vacunado	6,52 ^a	0,41 ^a	0,45 ^c	0,43 ^c
2	Cerda A – Cerdo placebo	6,34 ^a	0,39 ^a	0,46 ^d	0,42
3	Cerda A – Control Estricto	6,70 ^f	0,46 ^f	0,52 ^f	0,49 ^f
4	Cerda B – Cerdo vacunado	6,43 ^a	0,44 ^a	0,51 ^{c,e}	0,47 ^{c,e}
5	Cerda B – Cerdo placebo	6,07 ^a	0,41 ^a	0,039 ^{a,e}	0,39 ^e
6	Cerda B – Control Estricto	6,34 ^f	4,53 ^f	0,49 ^f	0,47 ^f

^a La comparación global **no** es significativamente diferente por el ensayo Chi-cuadrado.

^c La comparación de los Grupos 1 y 4 es significativamente ($P < 0,05$) diferente por el ensayo de Chi-cuadrado.

^d La comparación de los Grupos 2 y 5 es significativamente ($P < 0,05$) diferente por el ensayo de Chi-cuadrado.

10 ^d La comparación de los Grupos 4 y 5 es significativamente ($P < 0,05$) diferente por el ensayo de Chi-cuadrado.

^f Grupo no incluido en los análisis estadísticos tal como se indica en el protocolo.

Las observaciones clínicas de los cochinitos fueron registradas diariamente para cada animal desde el día de la exposición (día 42) hasta la finalización del estudio (día 63). Se calcularon las puntuaciones clínicas para obtener una puntuación clínica diaria media que reflejase la gravedad y la duración de la enfermedad entre los grupos de tratamiento debida a la exposición a un elemento aislado virulento de *Lawsonia*. Una puntuación de 3 era indicativa de un animal normal y saludable. Hubo pocas puntuaciones clínicas diferentes a "3" en cualquiera de los grupos después de la exposición virulenta, y no se produjeron diferencias significativas entre cualquiera de los grupos de tratamiento. Las puntuaciones clínicas medias de cada grupo de tratamiento se resumen a continuación en la Tabla 7.

15

Tabla 7: Puntuaciones clínicas medias de los cerdos

Grupo de tratamiento	Grupo de Identificación	Puntuación Clínica Media
1	Cerda A – Cerdo vacunado	3,01 ^a
2	Cerda A – Cerdo placebo	3,00 ^a
3	Cerda A – Control Estricto	3,00 ^f
4	Cerda B – Cerdo vacunado	3,01 ^a
5	Cerda B – Cerdo placebo	3,02 ^a
6	Cerda B – Control Estricto	3,00 ^f

20 ^a La comparación global **no** es significativamente diferente.

^f Grupo no incluido en los análisis estadísticos tal como se indica en el protocolo.

La evaluación serológica de los cochinillos mediante ensayo IFAT para determinar la presencia de anticuerpos IgG anti-*Lawsonia* se llevó a cabo con muestras de suero que fueron extraídas semanalmente de los animales evaluados. Las muestras de suero fueron extraídas los días 0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56 y 63. Antes de la exposición, algunos cochinillos de los Grupos 1-3 fueron seropositivos para *Lawsonia*, confirmando con ello que se induce algo de inmunidad materna durante la vacunación de la cerda. Por el contrario, todos los cochinillos de los Grupos 4-6 fueron seronegativos para *Lawsonia*. Los cochinillos del Grupo 1 presentaron números significativamente mayores ($P < 0,05$) de animales seropositivos, en comparación con el Grupo 4, el día del parto y en los días 7 y 14. Los cochinillos del Grupo 1 también fueron significativamente diferentes ($P < 0,05$) de los del Grupo 2 en el día 63 del experimento. El Grupo 2 presentó números significativamente mayores ($P < 0,05$) de animales seropositivos, en comparación con el Grupo 5, en los días 7, 14 y 28. La detección de anticuerpos maternos duró hasta el día 28 en los Grupos 1-3. Todos los animales de los Grupos 1-3 fueron seronegativos para el día 35. Tras la exposición virulenta, se detectó algo de seroconversión en los Grupos 1, 2, 4 y 5. Se percibió una diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los Grupos 1 y 4 en el día 56 del experimento. Las tasas de seroconversión de cada grupo se resumen a continuación en la Tabla 8.

Tabla 8: Resumen de las tasas de seroconversión entre los grupos de tratamiento de cerdos

Grupo de tratamiento	Grupos					
	1	2	3	4	5	6
	Cerda A – Cerdo vacunado	Cerda A – Cerdo placebo	Cerda A – Control Estricto	Cerda B – Cerdo vacunado	Cerda B – Cerdo placebo	Cerda B – Control Estricto
Parto	5/20 ^c	3/20	1/10 ^f	0/20 ^c	0/20	0/10 ^f
Día 7	7/20 ^c	4/20 ^d	3/10 ^f	0/20 ^c	0/20 ^d	0/10 ^f
Día 14	5/20 ^c	4/20 ^d	3/10 ^f	0/20 ^c	0/20 ^d	0/10 ^f
Día 21	2/20 ^a	3/20 ^a	2/10 ^f	0/20 ^a	0/20 ^a	0/10 ^f
Día 28	3/20	4/20 ^d	3/10 ^f	0/20 ^a	0/20 ^a	0/10 ^f
Día 35	0/20 ^a	0/20 ^a	0/10	0/20 ^a	0/20 ^a	0/10 ^f
Día 42	0/20 ^a	0/20	0/10	1/20 ^a	0/20	0/10 ^f
Día 49	0/19	0/20	0/10 ^f	2/20 ^a	1/20 ^a	0/10 ^f
Día 56	0/19 ^{a,c,*}	1/20 ^a	0/10 ^f	4/20 ^{a,c}	2/19 ^{a,*}	0/10 ^f
Día 63	0/19 ^{a,b,c,*}	8/20 ^b	0/10 ^f	5/20	9/18 [*]	0/10 ^f

^a La comparación global **no** es significativamente diferente por el ensayo Chi-cuadrado.

^b La comparación de los Grupos 1 y 2 es significativamente ($P < 0,05$) diferente por el ensayo de Chi-cuadrado.

^c La comparación de los Grupos 1 y 4 es significativamente ($P < 0,05$) diferente por el ensayo de Chi-cuadrado.

^d La comparación de los Grupos 2 y 5 es significativamente ($P < 0,05$) diferente por el ensayo de Chi-cuadrado.

^f Grupo no incluido en los análisis estadísticos tal como se indica en el protocolo.

^{*} Se produjo la muerte de animales en este grupo de tratamiento.

Discusión

Este estudio evaluó la seguridad de una vacuna de *Lawsonia* en cerdas después de dosis elevadas y repetidas de la vacuna durante la segunda y la tercera etapas de la gestación, cuyo objetivo era inducir un elevado nivel de respuesta de anticuerpos maternos. No se detectó *Lawsonia* en los tejidos mediante IHC o t-PCR, ni indicaciones de infección de *Lawsonia* mediadas a través de patologías macroscópicas en cualquiera de las cerdas vacunadas. Además, no se produjo la detección de pérdidas fecales de *Lawsonia* en ninguna de las cerdas vacunadas. Finalmente, las cerdas vacunadas presentaron valores numéricamente superiores de cochinillos vivos y saludables. Por consiguiente, todo indica a que la vacuna es segura en animales preñados.

Este complejo estudio incluyó tanto cerdas positivas en *Lawsonia* (Grupo A) como cerdas negativas en *Lawsonia* (Grupo B), cuyos cochinillos fueron vacunados posteriormente (Grupos 1 y 4) o no fueron vacunados (Grupos 2 y 5). Los cochinillos de los Grupos 3 y 6 sirvieron como controles estrictos y no recibieron tratamiento alguno o exposición

a la bacteria. El análisis de los datos y las posteriores conclusiones se realizaron comparando los grupos de tratamiento que variaban en una única variable (vacunación de cochinito o vacunación de cerda).

La eficacia de la vacuna en los cochinitos recién nacidos confirma que la fuente del cerdo era susceptible, y que la vacunación de dichos cochinitos proporcionó eficacia contra la exposición virulenta heteróloga. Esto requirió una comparación del Grupo 4 (vacunado) y del Grupo 5 (no vacunado), los cuales derivaban ambos de cerdas negativas en *Lawsonia*. Los datos indicaron que el Grupo 4 era significativamente diferente ($P < 0,05$) del Grupo 5 en puntuaciones medias de íleo macroscópicas, en puntuaciones medias de colon macroscópicas, en eliminación fecal (f-PCR), en colonización de tejido del íleo (t-PCR) y en ADWG. Como nota al margen, dicho estudio también confirmó que la Enterisol Ileit B3903 proporciona una protección eficaz después de una única administración. Además confirma y valida que la fuente de cerdos usada en el experimento era susceptible a la exposición virulenta heteróloga.

La comparación del Grupo 2 (cochinitos procedentes de una cerda del Grupo A) y del Grupo 5 (cochinitos procedentes de una cerda del Grupo B) permitieron la evaluación del potencial de protección materna obtenido a través de la vacunación de la cerda. Los datos indicaron que no había diferencias significativas ($P < 0,05$) entre los Grupos 2 y 5 en las puntuaciones medias de íleo macroscópicas, en las puntuaciones medias microscópicas de íleo y de colon, en la eliminación fecal (f-PCR), en la ADWG y en la serología. Estos datos también indicaron que había un cierto grado de inmunidad materna que proporciona protección frente a la exposición virulenta durante al menos seis semanas después del nacimiento. El estudio midió además la serología (IFA) y que determinó que podían detectarse cochinitos seropositivos en los Grupos 1-3 desde el día del parto y hasta el día 28. Cabe destacar que, el día del parto, todos los cerdos de todos los grupos eran seronegativos usando el ensayo IFA, lo que posiblemente implica que el ensayo usado en este experimento no proporciona un indicador preciso de inmunidad frente a la exposición virulenta a *Lawsonia*. Dada la naturaleza del agente etiológico como patógeno mucosal y del uso de una vacuna viva no virulenta, es posible que alguna forma de inmunidad celular deba ser considerada como un factor.

Otro objetivo de este estudio era determinar si la vacunación eficaz, cara a la inmunidad materna, podría llevarse a cabo vacunando a los cochinitos antes de lo que convencionalmente se hace o se recomienda. Para este ensayo, se confirmó la vacunación eficaz de los cochinitos de 16 a 26 días de edad. Esta determinación se realizó comparando el Grupo 1 (cochinitos vacunados procedentes de cerdas del Grupo A) y el Grupo 2 (cochinitos no vacunados procedentes de cerdas del Grupo A). Los parámetros primarios usados en esta comparación fueron las lesiones macroscópicas y microscópicas asociadas al íleo y al colon. Las puntuaciones medias de íleo macroscópicas fueron de 0,16 y 0,85 para los Grupos 1 y 2, respectivamente, siendo significativamente diferentes ($P < 0,05$). El porcentaje de muestras de íleos con lesiones macroscópicas fue del 16% y del 45% para los Grupos 1 y 2, respectivamente, y esto también supuso una diferencia significativa ($P < 0,05$). Los cochinitos del Grupo 1 también presentaron puntuaciones numéricamente menores, aunque no significativamente diferentes, de lesiones de colon macroscópicas y de lesiones microscópicas de íleo y de colon, y también una menor colonización de tejidos (t-PCR). En total, estos datos confirman que la vacunación proporciona una protección eficaz superior y a mayor plazo que la inmunidad materna por sí sola.

Todas las comparaciones de los demás grupos, excepto uno, discutidas anteriormente se basaron en un estudio de variable única, bien la vacunación de cerda bien la vacunación de cochinito, pero no de ambos. La comparación entre los Grupos 1 y 5 requirió la evaluación de los datos teniendo en cuenta dos variables de estudio (vacunación de cerda y vacunación de cochinito). Se destaca que los Grupos 2 y 5 eran estadísticamente diferentes ($P < 0,05$) en algunos parámetros y numéricamente inferiores en otros. Se puede asumir razonablemente que los Grupos 1 y 5 serían estadísticamente diferentes en la mayoría de los parámetros de estudio como en los Grupos 2 y 5. En resumen, se determinó que los Grupos 1 y 5 eran significativamente diferentes ($P < 0,05$) en numerosos parámetros que incluyen los parámetros de estudio primarios de puntuaciones macroscópicas de íleo, puntuaciones microscópicas de íleo y puntuaciones microscópicas de colon.

Finalmente, los Grupos 3 y 6 (los grupos de control estricto) confirmaron el status de los cerdos en relación a la *Lawsonia* y validaron las fuentes de cerdos. Estos grupos no fueron incluidos en los análisis estadísticos. Todos los parámetros medidos y evaluados confirman que estos animales eran negativos en *Lawsonia*, excepto por las puntuaciones de lesiones microscópicas de un único cerdo del Grupo 6, que fue registrado como positivo en *Lawsonia*. En base a los datos acumulados de todos los demás parámetros, se cree que se trató de un error.

REIVINDICACIONES

1. Uso de una cantidad eficaz de antígeno de *Lawsonia intracellularis* para la preparación de un medicamento para proporcionar una protección aumentada contra la infección de *Lawsonia intracellularis* en un animal joven mediante un método, en el que
- 5 (A) la madre de dicho animal joven ha de ser vacunada con dicho medicamento mientras dicha madre está embarazada de dicho animal joven y
- (B) dicho animal joven ha de ser vacunado con una dosis eficaz de dicho medicamento durante las tres primeras semanas de vida,
- 10 en donde dicho animal joven es un cochinito, y, en donde dicho antígeno es una bacteria de *Lawsonia intracellularis* viva modificada.
2. El uso de la reivindicación 1, comprendiendo dicha dosis eficaz en la etapa (b) entre aproximadamente 10^3 y aproximadamente 10^9 bacterias *Lawsonia intracellularis* por dosis.
3. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, comprendiendo dicha dosis eficaz en la etapa (b) entre 3,0 TCID₅₀ a aproximadamente 6,0 TCID₅₀ bacterias *Lawsonia intracellularis* por dosis.
- 15 4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, administrándose dicha vacuna a dicho animal joven entre 12 y 21 días después del nacimiento.
5. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, administrándose dicha vacuna a dicho animal joven entre 15 y 21 días después del nacimiento.
- 20 6. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, administrándose dicha vacuna a dicho animal joven entre 19 y 21 días después del nacimiento.
7. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde en la etapa (b) dicho animal joven ha de ser vacunado antes de que dicho animal alcance las tres semanas de edad.
8. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, comprendiendo dicha etapa de vacunación (b) la administración de una dosis única de dicha vacuna.
- 25 9. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, incluyendo dicha etapa de vacunación la etapa de administrar dicha vacuna por vía oral.
10. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, estando dicha madre vacunada con dosis repetidas de vacuna antes de parir dicho animal joven.
- 30 11. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, recibiendo dicha madre tres vacunaciones con dicha primera vacunación entre 50 y 60 días antes de parir dicho animal joven.
12. El uso de la reivindicación 11, ocurriendo dicha segunda vacunación entre 30 y 40 días antes de parir dicho animal joven.
13. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, ocurriendo dicha tercera vacunación entre 10 y 20 días antes de parir dicho animal joven.
- 35 14. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 - 13, estando dicha vacunación en la etapa (a) con una dosis de al menos $3 \times 10^{3,0}$ a $3 \times 10^{9,0}$ TCID₅₀ de bacteria *Lawsonia intracellularis* modificada viva.
15. El uso de la reivindicación 14, en el que dicha bacteria viva modificada de *Lawsonia intracellularis* se selecciona del grupo que consiste en el N° de Acceso de ATCC PTA-4926, N° de Acceso ATCC 55783, y combinaciones de los mismos.
- 40 16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, dicha vacunación de la madre de dicho animal joven se produce durante la segunda o tercera etapas de gestación de dicho animal joven.