

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 676 833**

51 Int. Cl.:

A61K 39/102 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2013 PCT/EP2013/074930**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2014 WO14083091**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2013 E 13795795 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 2925354**

54 Título: **Vacuna para proteger a un rumiante contra la neumonía causada por Pasteurella multocida**

30 Prioridad:

29.11.2012 EP 12194759

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

25.07.2018

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
P.O. Box 31 Wim De Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

JACOBS, ANTONIUS ARNOLDUS CHRISTIAAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 676 833 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 para proteger a un rumiante contra la neumonía causada por *Pasteurella multocida*

5 La presente invención se refiere a una vacuna para proteger a un rumiante contra la neumonía causada por *Pasteurella multocida*. La invención también se refiere a la fabricación de tal vacuna y a un procedimiento para proteger a un rumiante contra la neumonía causada por *Pasteurella multocida*.

10 En general, las bacterias de *Pasteurella multocida* pueden causar enfermedades en animales salvajes y domesticados, así como en seres humanos. La bacteria se puede encontrar en aves de corral, felinos, caninos, conejos, ganado vacuno y cerdos. En aves, *Pasteurella multocida* puede causar cólera aviar. El serotipo A:1 de *Pasteurella multocida* está más asociado con el cólera aviar. El serotipo D de *Pasteurella multocida* puede causar rinitis atrófica en cerdos. Ciertos serotipos, tales como B:2 pueden causar septicemia hemorrágica, una infección sistémica en rumiantes, por ejemplo en bovinos (es decir, animales que pertenecen al género *Bos*, tales como vacas, novillos, bueyes, cualquier otro ganado, búfalos, etc.). Las bacterias que pertenecen al serogrupo A, en particular el serotipo A:3, pueden causar neumonía en los rumiantes, en particular en bovinos. La neumonía es una infección local del tracto respiratorio inferior (en bovinos a menudo asociada a la enfermedad respiratoria bovina). La presente invención se refiere a aquellas bacterias que causan dicha neumonía en rumiantes, en particular bovinos.

20 Las bacterias *Pasteurella multocida* que causan neumonía en los rumiantes son un comensal del tracto respiratorio superior de estos animales (Allen et al.; Can. J. Vet. Res., 1992, 56: 177-183). En otras palabras, el tracto respiratorio superior (que incluye la cavidad nasal, la faringe y la laringe) de la mayoría de los animales alberga estas bacterias sin causar ninguna reacción fisiológica, tal como una enfermedad o una respuesta inmune contra estas bacterias. La inducción de la enfermedad a menudo se asocia con estrés, especialmente por el transporte o la infección con virus patógenos. La protección contra la enfermedad (que incluye ayudar a prevenir o mejorar la enfermedad) puede tener lugar mediante vacunación sistémica de los animales con una vacuna que comprende bacterias *P. multocida* vivas o muertas como se conoce habitualmente en la técnica (véase, por ejemplo, S.M. Dabo et al. en *Animal Health Research Reviews*, 8 (2), 2008, 129-150). En general, a la hora de vacunar a animales muy jóvenes, (es decir, de menos de 3-4 semanas de edad) puede ser preferente una vacuna que comprenda bacterias vivas. Generalmente, una vacuna con microorganismos muertos es menos eficaz en presencia de anticuerpos maternos. Sin embargo, por otro lado, una vacuna con microorganismos vivos puede ser menos segura en dichos animales jóvenes. En particular, puede producirse un shock después de vacunar a animales jóvenes con las bacterias vivas atenuadas de los serotipos causantes de neumonía.

35 Confer et al. (Amer. J. of Vet. Res., 1996, 57: 1453-1457) estudiaron las respuestas de anticuerpos contra las proteínas de membrana externa de *Pasteurella*, después de la vacunación y la exposición de terneros de 5-8 meses de edad. Las vacunas se prepararon a partir de un aislado de campo de *P. multocida* A: 3 y se administraron dos veces con un intervalo de 7 días. Consistieron en bacterias vivas administradas por vía subcutánea o por exposición del cuerpo entero a un aerosol, o en bacterias muertas administradas por exposición a aerosoles. Las vacunas aplicadas por Confer et al. no fueron muy efectivas, ya que requirieron 2 administraciones: una vacunación de sensibilización y otra de refuerzo. Además, la vía de administración por exposición a aerosoles de todo el cuerpo es totalmente impracticable para la vacunación a gran escala o para el uso en condiciones de campo: requería la incubación de pequeños grupos de animales a la vez, durante al menos 15 minutos en una habitación cerrada.

45 El objetivo de la invención es proporcionar una vacuna que proteja, es decir, al menos ayude a prevenir, mejore, en realidad prevenga o cure, contra la neumonía causada por *Pasteurella multocida*, cuya vacuna es segura en animales jóvenes.

50 Para este fin, se ha ideado una vacuna para la administración en las vías respiratorias superiores de un rumiante, en la que la vacuna comprende bacterias de *Pasteurella multocida* vivas atenuadas, teniendo lugar la administración a través de la atomización de la vacuna. Es decir, la vacuna se administra pulverizándola como una neblina de partículas finas (con un diámetro medio promediado en volumen de menos de 200 μm) para alcanzar las vías respiratorias altas del animal. Se espera que la administración de las bacterias de *Pasteurella multocida* atenuadas en las vías respiratorias altas sea intrínsecamente segura, ya que incluso las bacterias de tipo salvaje generalmente no inducen enfermedad cuando están presentes en las vías respiratorias altas. Sin embargo, no se esperaba de antemano que se produjera una respuesta inmunitaria (y mucho menos una respuesta adecuada) contra las bacterias de *Pasteurella multocida* vivas atenuadas: incluso las bacterias de tipo salvaje cuando están presentes en esta parte de las vías respiratorias no inducen una respuesta inmunitaria en circunstancias normales. Sorprendentemente, administrando bacterias de *Pasteurella multocida* vivas atenuadas (del tipo que causa neumonía en rumiantes en la forma no atenuada, en particular del serogrupo A, en particular del serotipo A:3) en las vías respiratorias altas en forma de una fina neblina de partículas, se induce una respuesta inmunitaria adecuada contra bacterias de *Pasteurella multocida* vivas atenuadas. Se observa que la atomización puede realizarse no solo cuando la vacuna está en forma líquida (las partículas son gotas), sino también cuando la vacuna está en forma sólida (por ejemplo, un polvo o torta liofilizados de las cepas en un estabilizador), en cuyo caso la vacuna se puede extender como un polvo fino, normalmente una torta liofilizada en polvo de la bacteria en una matriz estabilizadora. Se estima que es práctico un límite inferior de las partículas atomizadas (al menos, el diámetro medio promediado en

volumen) de 1 μm , ya que para obtener partículas más pequeñas puede ser necesario un alto aporte de energía que podría ser poco práctico.

5 La vacuna resultante es segura en terneros jóvenes (menos de 3-4 semanas de edad) y provoca una respuesta inmunitaria adecuada contra las bacterias de *Pasteurella multocida* causantes de la neumonía (es decir, provoca una respuesta inmunitaria que al menos ayuda a prevenir, mejora, en realidad previene o cura la neumonía causada por bacterias de *Pasteurella multocida*). Se conocen muchas cepas atenuadas de *Pasteurella multocida* (por ejemplo, la cepa dependiente de estreptomycin como se conoce de la referencia de Dabo mencionada anteriormente, o cepas que tienen mutaciones en los genes phyB, phyA, hyaE, hyaD, hyaC, hyaB, hexD, hexC, hexB y/o hexA, como se describe en el documento US 2008/0241192 (Kumar et al.). Sin embargo, el tipo de atenuación no es importante para la invención como tal. La invención se refiere a el sorprendente hallazgo de que una respuesta inmunitaria contra bacterias de *Pasteurella multocida* vivas atenuadas puede ser provocada incluso si estas bacterias se administran en las vías respiratorias altas (donde *P. multocida* de tipo salvaje está presente como comensal y no induce una respuesta inmunitaria), si la administración se lleva a cabo mediante atomización. De hecho, el tipo de atenuación puede afectar a la virulencia restante de la bacteria y, por lo tanto, a la seguridad y eficacia de la vacuna. Sin embargo, el equilibrio de la seguridad y la eficacia para encontrar la atenuación deseada no se refiere a el descubrimiento mencionado anteriormente de la presente invención.

20 La invención también se refiere al uso de bacterias de *Pasteurella multocida* vivas atenuadas para la fabricación de una vacuna que, tras la administración en las vías respiratorias altas de un rumiante mediante atomización intranasal de la vacuna, proporciona protección contra la neumonía causada por bacterias de *Pasteurella multocida*, y a un procedimiento para proteger a un rumiante contra la neumonía causada por bacterias de *Pasteurella multocida*, comprendiendo el procedimiento la administración de una vacuna, que comprende bacterias de *Pasteurella multocida* vivas atenuadas, en las vías respiratorias altas del rumiante por atomización de la vacuna.

25 Aunque la administración en las vías respiratorias altas podría tener lugar a través de, por ejemplo, la boca del animal (administración oral de una neblina fina de partículas para alcanzar la faringe y, opcionalmente, la laringe), la vacuna de la invención es para administración intranasal. Se ha demostrado que la administración intranasal conduce a una buena respuesta inmunitaria de la mucosa contra las bacterias.

30 Como es bien sabido en la técnica, la administración intranasal se define como la administración "dentro de la nariz" (The American Heritage® Medical Dictionary, Houghton Mifflin Co.).

35 En una realización, la atomización proporciona una niebla de partículas de vacuna que tienen un tamaño promedio de partícula (volumen) por debajo de 50 μm de diámetro. Se reconoce que al tener partículas más pequeñas, mayor es la superficie de la mucosa que puede ser alcanzada directamente por la vacuna. Se cree que esto lleva a una respuesta inmunitaria mejorada. Se ha demostrado que un tamaño de partícula inferior a 50 μm es práctico y adecuado para provocar una respuesta inmunitaria. En una realización adicional, el tamaño promedio de partícula está entre 20 y 40 μm de diámetro.

40 En otra realización más, la vacuna comprende adicionalmente virus parainfluenza-3 vivo atenuado y virus sincitial respiratorio bovino vivo atenuado para la protección contra la enfermedad respiratoria causada por el virus parainfluenza y el virus sincitial respiratorio bovino. Se cree que añadiendo virus inmunogénicos a la vacuna, de modo que los virus estimulen la respuesta inmunitaria de la mucosa en las vías respiratorias altas, también se obtendrá una respuesta inmunitaria mejorada contra la bacteria *Pasteurella*. Aunque los virus en la vacuna son inmunogénicos, están atenuados y, por lo tanto, no inducen la enfermedad. Esto significa que no causan efectos patológicos reales en la mucosa de las vías respiratorias, en contraste con sus homólogos de tipo salvaje. Se cree que la cepa o tipo de atenuación particular de las cepas de virus no es esencial para esta realización: dado que los virus son (inherentemente) totalmente ajenos a la bacteria, la respuesta inmunitaria específica contra los virus simplemente no puede ser esencial para obtener mejor protección contra la bacteria. Muchos virus de parainfluenza-3 vivos atenuados y virus sincitiales respiratorios bovinos vivos que provocan una respuesta inmunitaria después de la administración en las vías respiratorias altas son conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, por las vacunas comercialmente disponibles Inforce™ 3 (Pfizer Animal Health), Nasalgen™ IP (Merck Animal Health), TSV-2™ (Pfizer Animal Health) y ONSET™ 5 (Merck Animal Health).

55 En otra realización, la vacuna comprende virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa vivos atenuados. También se sabe que este virus está implicado en enfermedades respiratorias, en particular de bovinos, y por lo tanto, se cree que la protección contra este patógeno potencia aún más el efecto protector de la vacuna actual contra la enfermedad respiratoria.

60 En una realización adicional, la vacuna para su uso de acuerdo con la invención es para administración a bovinos, preferentemente a una edad de menos de 3-4 semanas.

65 Se observa que una vacuna en el sentido de la presente invención es una constitución adecuada para la aplicación a un animal, comprendiendo uno o más antígenos en una cantidad inmunológicamente eficaz (es decir, capaz de estimular el sistema inmunitario del animal objetivo lo suficiente como para al menos reducir la efectos negativos de una exposición a los microorganismos de tipo salvaje), combinados normalmente con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un líquido que contiene agua, comprendiendo opcionalmente agentes

inmunoestimulantes (adyuvantes), que, tras la administración al animal, induce una respuesta inmunitaria para tratar un enfermedad o trastorno, es decir, ayudar a prevenir, mejorar o curar la enfermedad o trastorno.

5 En general, puede fabricarse una vacuna usando procedimientos conocidos en la técnica que comprenden básicamente mezclar los antígenos (o una composición que contiene los antígenos) con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un vehículo líquido, tal como agua (opcionalmente tamponada), o un vehículo sólido tal como se usa habitualmente para obtener vacunas liofilizadas. Para una vacuna con microorganismos vivos, una cantidad inmunológicamente eficaz está, normalmente, entre 10^4 - 10^9 UFC/dosis para bacterias y entre 10^3 - 10^{10} DICT₅₀/dosis para virus, aunque dependiendo de la atenuación, la cantidad puede ser menor (para microorganismos menos atenuados) o más alta (para microorganismos más atenuados). Opcionalmente, se añaden otras sustancias, tales como adyuvantes, estabilizadores, modificadores de la viscosidad u otros componentes, dependiendo del uso previsto o de las propiedades deseadas de la vacuna. Para la vacunación son adecuadas muchas formas, en particular formulaciones líquidas (con antígenos disueltos, emulsionados o suspendidos; los volúmenes de administración típicos están entre 0,1 y 10 ml, preferentemente entre 0,2 y 5 ml, preferentemente 2 ml o menos) pero también pueden ser adecuadas las formulaciones sólidas, tales como polvos para dispositivos de atomización.

20 En una realización adicional, la vacuna para su uso de acuerdo con la invención se aplica mediante una única administración, preferentemente el volumen administrado se divide para ambas fosas nasales.

El término atenuado como se usa en el presente documento se refiere a la incapacidad de un microorganismo, en particular una bacteria o virus, para inducir un conjunto completo de síntomas de la enfermedad que normalmente están asociados con su homólogo patogénico virulento (a menudo de tipo salvaje). Puede atenuarse de tal forma que no se replique dentro de una célula o animal huésped, o se replique a una velocidad que no sea significativamente perjudicial para la célula o el animal, y/o no induzca una respuesta perjudicial del huésped. Una cepa atenuada puede exhibir una capacidad reducida para sobrevivir en un huésped y puede contener una o más mutaciones en uno o más genes de virulencia como se conoce habitualmente en la técnica.

30 En una realización, la vacuna para su uso de acuerdo con la invención que comprende bacterias de *Pasteurella multocida* vivas atenuadas para la protección de un rumiante contra la neumonía causada por *P. multocida* mediante la administración de la vacuna a las vías respiratorias altas del rumiante mediante atomización de la vacuna, se caracteriza por que la administración se lleva a cabo mediante atomización intranasal; las partículas de vacuna tienen un tamaño promedio de partícula entre 20 y 40 μm de diámetro; la vacuna comprende adicionalmente virus de parainfluenza-3 vivos atenuados y virus sincitial respiratorio bovino vivos atenuados, y opcionalmente, también comprende virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa; las bacterias *P. multocida* vivas atenuadas proceden de una cepa dependiente de estreptomicina.

La invención se explicará adicionalmente basándose en los siguientes ejemplos.

40 Ejemplo 1

Se evaluaron varios dispositivos de atomización con respecto al tamaño de partícula obtenido. En este ejemplo, se probaron tres cánulas, que se pueden fijar a las jeringas estándar. La primera cánula es la LMA MAD Nasal™ ("MAD"), disponible en LMA North America Inc, San Diego, CA, EE. UU. La segunda cánula es el aplicador Rispoval ("Pfizer"), disponible en Pfizer Animal Health, Bruselas, Bélgica. La tercera cánula es la boquilla aplicadora flexible azul de 1" disponible en Genesis Industries, Inc. Elmwood, Wisconsin, EE.UU. ("Genesis").

50 Estas cánulas se probaron con WFI regular (agua para inyectables) y el tamaño promedio en volumen de la gota obtenido se estableció usando un analizador de tamaño de partículas Sympatec™. Los resultados se indican a continuación en la Tabla 1.

Tabla 1 Tamaño medio de la gota con varias cánulas

Tipo de cánula	Tamaño promedio en volumen (diámetro en μm)	Desviación estándar (μm)
MAD	32,8	8,8
Pfizer	39,5	4,6
Genesis	197	No determinado

55 Parece que con las tres cánulas se puede lograr la atomización del WFI. Para los experimentos posteriores se utilizó la cánula MAD.

Ejemplo 2

Se usaron dos grupos (llamados Grupo 1 y Grupo 2), consistente cada uno en veinte terneros de 2 semanas de edad (captura limpia y privados de calostro) para los experimentos. En cada grupo, se vacunó a diez terneros una vez por vía intranasal con la vacuna de *Pasteurella multocida* vivas (véase a continuación) y se dejaron diez terneros como controles no vacunados. A las cinco semanas de edad, se expuso a todos los terneros por vía intratraqueal con *P. multocida* de tipo salvaje. Durante 7 días después de la exposición, se observó que los terneros desarrollaban signos clínicos de enfermedad respiratoria, en particular neumonía.

A los 7 días de la exposición (o antes en caso de signos clínicos graves), se sacrificó a los terneros y se realizó la necropsia, es decir, se examinaron en busca de lesiones pulmonares. Los experimentos con el segundo grupo tuvieron lugar varios meses después de los experimentos con el primer grupo.

Vacuna

En ambos grupos, se utilizó una vacuna que contenía una cepa Δ hyaE de *Pasteurella multocida*, derivada de la cepa P1062 de serotipo A:3 De tipo salvaje que carece de la cápsula (véase en Genbank EMBL AAK02858.1, el gen). Justo antes de la administración, las bacterias se disolvieron en WFI (agua para inyectables) para alcanzar aproximadamente 5×10^7 UFC/ml. La UFC/ml real fue de 4×10^7 para el Grupo 1 y de 8×10^7 para el Grupo 2.

Se ha previsto otro experimento en el que la vacuna, además de la cepa de *Pasteurella multocida* mencionada anteriormente, contiene BRSV vivos atenuados (por ejemplo, las mismas cepas que en el producto "Jencine™ 4", disponible en Merck Animal Health, Summit, NJ, EE.UU.) y virus Pi3 vivos atenuados (por ejemplo, la misma cepas que en el producto Bovilis™ IBR-Pi3 vivos, disponible en MSD Animal Health, Boxmeer, Países Bajos).

Cultivo para exposición

Para la exposición con *Pasteurella* de tipo salvaje, se realizaron dos cultivos para exposición, uno homólogo de la cepa vacunal, el otro heterólogo. Para el cultivo para exposición homólogo se inoculó *Pasteurella multocida* P1062 en agar sangre y se incubó 16-24 horas a 37 °C. Posteriormente, se realizó una inoculación con el asa en 100 ml de TPB y se incubó durante 7-10 horas a 37 °C. Para el cultivo para exposición heterólogo se inoculó *Pasteurella multocida* 971/90 en agar sangre y se incubó durante 16 horas a 37 °C. Posteriormente, se realizó una inoculación con el asa en 100 ml de TPB y se incubó durante 4-5 horas a 37°C.

Ambos cultivos se diluyeron con PBS con un objetivo de aproximadamente $3,3 \times 10^8$ UFC/ml. Se observa que, dado que *Pasteurella multocida* es un patógeno secundario (es decir, en general no causa la enfermedad), se requirió una dosis de exposición muy alta, en combinación con la administración a la parte inferior de las vías respiratorias (véase a continuación), para inducir neumonía.

Vacunación

Para cada grupo, se dividió a los terneros en dos subgrupos (grupos A y B) de 10 animales. Se vacunó al grupo A una vez por vía intranasal administrando 2 ml de la vacuna viva reconstituida en una fosa nasal, el grupo B se dejó como controles no vacunados. En el grupo 1, la vacuna se administró utilizando una jeringa de plástico normal, lo que condujo a la administración de la vacuna como una corriente de fluido, que se disgrega en grandes gotas. En el Grupo 2, la vacuna se administró utilizando el dispositivo MAD, lo que condujo a la atomización de la vacuna.

Exposición

A las 5 semanas de edad (3 semanas después de la vacunación), se expuso a todos los terneros por vía intratraqueal a 30 ml de cultivo de exposición, con el objetivo de obtener una dosis de exposición de aproximadamente 1×10^{10} UFC por animal.

El grupo 1 se expuso al cultivo homólogo, el grupo 2 se expuso al cultivo heterólogo.

Análisis de la seguridad

Con el fin de evaluar la seguridad de la vacuna, se sometió a los animales a observación a diario para evaluar la salud y el comportamiento general.

Exploración post mortem

Siete días después de la exposición, se sometió a los animales a una exploración *post mortem* con especial atención a los pulmones. Para cada lóbulo pulmonar se registró el % de consolidación, que corresponde a neumonía real. Además, se volvió a aislar *Pasteurella multocida* a partir de muestras *post mortem* para determinar la carga bacteriana de los pulmones con la bacteria. Para ello, se extirparon muestras de tejido de ocho sitios estándar representativos de los lóbulos de cada mitad del pulmón (4 sitios por mitad); el tejido enfermo se seleccionó,

preferentemente, para cada sitio, si estaba presente. Las muestras de imagen especular (las dos muestras del lóbulo equivalente en cada mitad) se combinaron para obtener 4 muestras por ternero. Cada muestra combinada se sumergió en agua hirviendo durante 3 segundos, se homogeneizó, se diluyó en serie 10 veces y se inoculó (100 µl) en placas de agar con sangre y, a continuación, se incubó durante 16-24 horas a 37 °C.

5

Análisis estadístico

Se evaluaron las puntuaciones de consolidación y reislamiento pulmonar mediante la prueba U de Mann-Whitney usando el programa estadístico Statistix™ para Windows.

10

Resultados

Seguridad

15 La vacunación con ambas vacunas pareció ser segura y no se observaron signos clínicos relacionados con la neumonía o el shock.

Neumonía y reislamiento

20 En las Tablas 2 y 3, se muestran los resultados de las puntuaciones *post mortem* para la neumonía (porcentaje de consolidación pulmonar) y el reislamiento de *Pasteurella multocida* (log10 UFC) para el Grupo 1. Tal como se puede observar, los resultados indican que no se pudieron obtener efectos protectores sustanciales con la vacuna con *Pasteurella multocida* viva mediante la administración de la vacuna en forma de una corriente líquida que se disgrega en grandes gotas. La incertidumbre real de cualquier efecto fue de 0,43 para la consolidación pulmonar y de 0,60 para las puntuaciones de reislamiento.

25

En las Tablas 4 y 5, se indican los resultados correspondientes para el grupo 2, vacunado con la vacuna viva administrada en las vías respiratorias altas por atomización de la vacuna y expuesto a la cepa de PM (*P. multocida*) heteróloga (que, cuando se compara con una exposición homóloga generalmente hace que sea más difícil obtener protección). Tal como se puede observar, las puntuaciones de las lesiones pulmonares se redujeron sustancialmente en aproximadamente un 50 %. Aunque el análisis estadístico reveló que todavía hay una incertidumbre de 0,12 (que en realidad es bastante baja dado el pequeño grupo de animales), está claro que existe al menos una protección parcial, a pesar del hecho de que la exposición fue a *P. multocida* de tipo salvaje heteróloga. Con respecto al reislamiento, parece haber una disminución de la carga bacteriana en 1.5^{10} log, que equivale a una disminución de la carga bacteriana de aproximadamente un factor 30 (que es un factor diez veces mayor que en el Grupo 1). La incertidumbre estadística es solo de 0,10 a pesar del hecho de que el experimento se llevó a cabo en un grupo tan pequeño.

30

35

Tabla 2: % de consolidación pulmonar, Grupo 1

Grupo	Vacuna	puntuación promedio total
1A	PM viva, líquido	82,4
1B	-	105,6

40

Tabla 3: Reislamiento (carga bacteriana en los pulmones), Grupo 1

Grupo	Vacuna	puntuación promedio total
1A	PM viva, líquido	4,7
1B	-	5,2

Tabla 4: % de consolidación pulmonar, Grupo 2

Grupo	Vacuna	puntuación promedio total
2A	PM viva, atomización	93
2B	-	180

45

Tabla 5: Reaislamiento (carga bacteriana en los pulmones), Grupo 2

Grupo	Vacuna	puntuación promedio total
2A	PM viva, atomización	2,8
2B	-	4,3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Vacuna que comprende bacterias atenuadas vivas de *Pasteurella multocida* para su uso en la protección de un rumiante contra la neumonía causada por *P. multocida* mediante la administración de la vacuna en las vías respiratorias superiores del rumiante mediante la atomización de la vacuna, caracterizada por que la administración tiene lugar por atomización intranasal y por que *P. multocida* pertenece al serogrupo A.
- 10 2. Vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada por que la atomización proporciona una neblina de partículas de vacuna que tienen un tamaño promedio por debajo de 50 µm de diámetro.
3. Vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada por que el tamaño promedio de partícula está entre 20 y 40 µm de diámetro.
- 15 4. Vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizada por que la vacuna comprende adicionalmente virus parainfluenza-3 vivo atenuado y virus sincitial respiratorio bovino vivo atenuado para la protección contra la enfermedad respiratoria causada por el virus parainfluenza y el virus sincitial respiratorio bovino.
- 20 5. Vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, caracterizada por que comprende el virus vivo atenuado de la rinotraqueítis bovina infecciosa para la protección contra la enfermedad respiratoria causada por el virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa.