

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 702 089**

51 Int. Cl.:

C12N 7/08 (2006.01)

A61K 39/215 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.08.2009 PCT/US2009/053085**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2010 WO10017440**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2009 E 09791266 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.10.2018 EP 2331682**

54 Título: **Vacunas contra bronquitis infecciosa derivadas de cepas similares a QX-BI**

30 Prioridad:

08.08.2008 US 87228 P

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

27.02.2019

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)
10 Sylvan Way
Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**GEERLIGS, HARMEN, JACOB;
MEINDERS, CINDY, ALEIDA, MARIA;
BOELM, GEERT, JAN y
STURMAN, BASTIANA, GEERTRUIDA,
ELISABETH**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 702 089 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

Vacunas contra bronquitis infecciosa derivadas de cepas similares a QX-BI

Campo

5 La presente invención se refiere al campo de vacunas contra enfermedades infecciosas aviares. Más específicamente, la presente invención se refiere a nuevas vacunas contra el virus de la bronquitis infecciosa (BI).

Antecedentes

10 El virus de la bronquitis infecciosa (BI) es un coronavirus que causa enfermedades respiratorias en aves de corral domésticas (por ejemplo, pollos). Los síntomas de la enfermedad de la BI incluyen, por ejemplo, insuficiencia respiratoria, reducción de peso, reducción en la producción de huevos, aumento en la frecuencia de huevos anómalos e índices de mortalidad aumentados.

15 Se han identificado varios genotipos y serotipos diferentes de los virus de la BI. La genotipificación de los virus de la BI se consigue generalmente por secuenciación de todo o parte del gen que codifica la proteína S1 (espiga) del virus. La proteína S1 es el producto de escisión N-terminal de una glicoproteína S más larga codificada por el genoma de los virus de la BI. El producto de escisión C-terminal de la glicoproteína S recibe el nombre de proteína S2. La proteína S1 se encarga de la unión celular y es un determinante antigénico principal para los virus de la BI. Los genotipos ejemplares (o "cepas") de los virus de la BI incluyen 793B, Massachusetts, Italy02, D274, Arkansas, B1648 y D1466. (Véase, por ejemplo, Worthington y col. (junio del 2008), *Avian Pathology* 37:247-257).

20 A finales de los 90, se identificó por primera vez en China un nuevo genotipo del virus de la BI, denominado "QX" (denominado también "QXVBI"). (Véase Liu y col. *Avian Pathology*, vol. 33, n.º 3, 1 de junio de 2004 (01-06-2004), páginas 321-327, *Archives of Virology* 151:1133-1148 (2006)). Desde la identificación del genotipo QX original, se han identificado en todo el mundo numerosos genotipos del virus de la BI con un elevado grado de similitud/identidad con QX a nivel de la secuencia nucleótidos de S1. Estos virus "similares a QX-BI" (como se definen adicionalmente en el presente documento) se han identificado, por ejemplo, en Francia, Alemania, Países Bajos, Bélgica, Reino Unido, Italia y Polonia.

25 Evidentemente, los virus similares a QX-BI plantean una grave amenaza en la industria de las aves de corral. A pesar de la rápida aparición significativa de este tipo de virus de la BI hasta ahora ninguna vacuna específica contra los virus similares a QX-BI había estado disponible o se había descrito en la técnica. Se han desvelado derivados de BI atenuados y vacunas, véase Liu y col. *Avian Pathology*, vol. 36, n.º 3, junio de 2007 (2007-06), páginas 231-234; Huang y col. *Vaccine*, vol. 24, n.º 6, 6 de febrero de 2006 (2006-02-06), páginas 785-791; Huang y col., *Avian Pathology*, vol. 36, n.º 1, febrero de 2007 (2007-02), páginas 59-67; Bijlenga y col., *Avian Pathology*, vol. 33, n.º 6, 1 de diciembre de 2004 y el documento US 2008/026449A1. Se ha descubierto que las vacunas contra la BI comercialmente disponibles (cepas vivas, atenuadas) son ineficaces en cuanto a la protección de pollos contra virus similares a QX-BI. Por lo tanto, existe una necesidad en la técnica de nuevas composiciones de vacunas y procedimientos de vacunación que proporcionen protección específica frente a virus QX-BI y similares a QX-BI.

Breve resumen de la invención

35 La presente invención satisface la necesidad en la técnica mencionada anteriormente al proporcionar una composición de vacuna que comprende: (i) un virus de la bronquitis infecciosa (BI) vivo y atenuado aislado derivado de un virus similar a QX-BI, seleccionándose dicho virus atenuado aislado de las cepas denominadas VSM65 L1148 QX BI que se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células (CECC, forma siglada del inglés *European collection of authenticated cell cultures*) con el N.º de acceso provisional 09061002, VSM80 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061004, VSM65 x+5 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061003 o VSM80 x+5 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el número de acceso provisional 09061001; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En un aspecto de la presente invención, la composición de vacuna descrita anteriormente se proporciona para su uso en la vacunación de un ave contra la bronquitis infecciosa (BI). En otro aspecto de la presente invención, la composición de vacuna descrita anteriormente se proporciona para su uso en la protección de un hospedador aviar, preferentemente un pollo, frente a un virus similar a QX de la bronquitis infecciosa (BI).

50 Los virus BI son útiles, entre otros, como componentes antigénicos en composiciones de vacuna que protegen contra la infección por virus QX-BI y similares a QX-BI. La invención incluye versiones vivas atenuadas de virus similares a QX-BI seleccionados de las cepas denominadas VSM65 L1148 QX BI que se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células (CECC) con el N.º de acceso provisional 09061002, VSM80 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061004, VSM65 x+5 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061003 o VSM80 x+5 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061001. Dichas cepas vivas, atenuadas pueden producirse, por ejemplo, realizando pases en serie de virus similares a QX-BI hasta obtener la atenuación adecuada. También se describen en el presente documento versiones inactivadas de virus similares a QX-BI. Los virus similares a QX-BI para su uso en vacunas pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de cepas depositadas de virus similares a QX-BI, casos de campo

de infección por virus similares a QX-BI o por construcción de virus de la BI recombinantes que expresan segmentos de genes definidos, predeterminados tal como una secuencia del gen de S1 en particular.

5 La presente invención también proporciona la composición de vacuna de la invención para su uso en la vacunación de un ave contra la bronquitis infecciosa, administrando al ave la composición de vacuna que comprende cepas vivas, atenuadas de virus similares a QX-BI.

10 La presente invención también proporciona una o más de las cepas denominadas VSM65 L1148 QX BI (que se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células (CECC) con el N.º de acceso provisional 09061002), VSM80 L1148A QX BI (que se depositó en la CECC bajo N.º de acceso provisional 09061004), VSM65 x+5 L1148A QX BI (que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061003) o VSM80 x+5 L1148A QX BI (que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061001) para su uso en la protección de un hospedador aviar, preferentemente un pollo, frente a un virus similar a QX de la bronquitis infecciosa (BI).

Breve descripción de los dibujos

Ninguna

Descripción detallada

15 Como se usa en el presente documento, la expresión "virus similares a QX-BI" significa cualquier virus con una proteína S1 codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene al menos una identidad del 95 % con la secuencia nucleótidos que codifica la proteína S1 de la cepa QX-BI original. La secuencia de nucleótidos que codifica la proteína S1 de la cepa QX-BI original se representa por la SEQ ID NO: 1 (véase Tabla 1) y está disponible con el nº de acceso AF193423 de Genbank del CNIB.

20 Tabla 1: Secuencia de Nucleótidos del Gen S1 de la Cepa QX-BI

```

atgttggggaagtcactgttttagtgaccatttgggtgactatgtagtgcaaattgttcgattctgctaataattatgtgt
actactaccaaagtccttaggcctccaaatggatggcatttgcagggggtcctatgcagtagtgaattccactaa
ttatagtaataatgcaggttctgcacctcagtcactgttggttattaaggacgtctataatcaaagtcggctctata
gctatgacagcacctctcagggtatggctgtgtaagtcacaattttagtgacactgtaactttctgaaattacag
ttttgtcacacattgtatagtagtgtagcgggtctgtcctataacaggcatgattccacgtgatcatattcgtattctg
caatgaaaaatggtctttttataatttaacagttagcgtatctaaataccctaattttaaacttttcaatgtgtaacaa
cttcacatctgttttaaatggtgatctgttttactccaacaaaactactgatgttacgtcagcaggtgtgattttaaa
gcagggtggacctgtaaattataatattgaaagaatttaaggtctgttactttgtaatggtacagcacaagatgta
atgttgcgataattccccaagggttgctagcctgtcaatataacactggcaattttcagatggctttatcctttacta
atagtaactttagtagggaaaagttcattgtctatcgcgaaagtagtgtaataactactctggcgtaactaattcacttta
ctaataagtaaatgcacagcctaatagtggtggtgtaatactttcatttatacaaacacaaacagctcagagtgggt
attataatttaattgtcattctgagtcagttgtgataaggcaagtgatttatgtatgggtcttaccaccctagttgtctt
tagaccagaaaccattaatagtggtttgtggttaattcctgtcagtttcttactatggaccctacagggagggtgt
aagcaatctgttttagtggaaggcaacgtgtgtatgcctactctataatggccaagggcatgtaagggtgtttatt
caggtgaattaagcatgaatttgaatgtgattgctggttatgttactaagagtcagctcgtatatacagactagaa
cggagcccttagtattaacgcaacacaattataataatattactttagataagtggtgcttataatataatggcagag
taggccaaggtttattactaatgtgactgattctgctgctaattttagtatttagcagatggtgggttagctatttagatac
gtcgggtgccatagatgtttgtgtaaaggcagctatggtcttaattattacaaggtaaccttgaagatgtaaac
caacagtttagtgctggtggcaatatagttggcattctactctagaaatgaaacaggttctgaacaggttgagaa
ccagtttatgtaagtaaccaatagctcacatcgtcagggcgttctattggccaaaacgtaacaacttgccttatgt
ta (SEQ ID NO:1)
    
```

Por lo tanto, cualquier virus con una proteína S1 codificada por una secuencia nucleótidos que tiene al menos una identidad del 95 % con la SEQ ID NO: 1 es un virus "similar a QX-BI" para los fines de la presente invención. Ejemplos de virus similares a QX-BI se exponen en Worthington y col. (junio 2008), *Avian Pathology* 37:247-257, incluyendo los genotipos de virus de la BI denominados L-1148 (denominado también en Worthington y col "NL/L-1148/04"), 1449-2 (denominado también en Worthington y col "NL/L-1449K/04"), 1449-10 (denominado también en Worthington y col "NL/L-1449T/04"), y Robertson (denominado también en Worthington y col, FR/L-1450T/05). En la siguiente Tabla 2 se exponen cepas ejemplares similares a QX-BI de las que pueden derivar los virus de la BI de la presente invención. Para fines de la presente invención, la expresión virus similares a QX-BI incluye, entre otros, los virus QX originales de la BI.

Tabla 2: Virus ejemplares similares a QX-BI

Denominación del Virus	Nº de Referencia de Genbank del CNBI (Gen S1)
NL/L-1148/04 (L-1148)	DQ431199
NL/L-1449K/04 (1449-2)	EF079115
NL/L-1449T/04(1449-10)	EF079116
FR/L-1450L/05 (Robertson)	EF079117
FR/L-1450T/05	EF079118
K10217-03	AY790363
IS/1201	DQ400359
K1255-03	AY790364
K3-3	AY790367
CK/CH/LSD/031	DQ167148
CK/CH/LLN/981	DQ167145
QX	AF193423
LS2	AY278246
A2	AY043312
HBN	DQ070837
NMC	DQ973113
IBVQ	DQ480155
SH	DQ480156
CK/CH/LXJ/021	DQ167152
LX4	AY189157
CK/CH/LSHH/031	DQ 167149
CK/CH/LJL/041	DQ 167144
CK/CH/LHLJ/04XI	DQ 167140
CK/CH/LSHH/03II	DQ 167150
CK/CH/LHLJ/04V	DQ 167139
CK/CH/LHLJ/991	DQ167142
DB03	AB274271
LH2	AY180958
CK/CH/LHLJ/07V	EU563943
CK/CH/LHLJ/07I	EU563942
HH06	EF577030
WF	DQ480151

Además de la comparación de secuencia de la secuencia que codifica a S1, para identificar virus similares a QX-BI, pueden usarse otros procedimientos. Dichos procedimientos pueden usarse, por ejemplo, como seleccionadores preliminares para identificar virus candidatos similares a QX-BI de un gran conjunto de muestras virales. Si mediante uno de estos seleccionadores preliminares se detecta un virus positivo que es similar a QX-BI, el genotipo de este virus puede confirmarse después por secuenciación y comparación génica de nucleótidos de S1, como se describe

en cualquier sitio en el presente documento. Un procedimiento ejemplar "preliminar" para identificar virus similares a QX-BI (o supuestos virus similares a QX-BI) es la neutralización en suero en el que se ensaya el antisuero de un animal infectado por el virus QX-BI o un virus similar a QX-BI para determinar su capacidad de neutralizar a un virus candidato. El resultado de una neutralización positiva puede sugerir que el virus candidato es un virus similar a QX-BI.

Otro procedimiento de selección preliminar ejemplar para virus similares a QX-BI es el Polimorfismo de Longitud del Fragmento de Restricción (PLFR). En este caso, se produce una copia de ADN del gen S1, a partir de un virus candidato, por RT-PCR. Después, la copia de ADN se expone a una enzima de restricción que se sabe que escinde el gen S1, de las cepas similares a QX-BI, en posiciones que no se escinden en el gen S1 de cepas no similares a QX-BI (o viceversa). Pueden visualizarse diferencias en la digestión de los fragmentos de restricción, por separación de tamaño del ADN digerido resultante, por ejemplo, por electroforesis en gel.

Los virus de la BI aislados descritos en el presente documento pueden derivar de cualquiera de los virus similares a QX-BI mencionados en el presente documento, así como de cualquier otro virus similar a QX-BI que pueda aislarse en el sitio. Además, expertos habituales en la materia, pueden obtener virus similares a QX-BI por procedimientos conocidos. Por ejemplo, pueden obtenerse virus similares a QX-BI seleccionando muestras (por ejemplo, frotis orofaríngeo) tomadas de pollos que se supone que están infectados por el virus de la BI o que presentan, de otra manera, uno o más síntomas de bronquitis infecciosa. En ARN se aísla de estas muestras y se genera una copia de ADN del gen de S1, o de una parte del mismo, por reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Después, la copia de ADN de S1 se secuencía y la secuencia de nucleótidos obtenida de esta manera se compara contra la secuencia de nucleótidos del gen de S1 de QX-BI (SEQ ID NO: 1) y se determina el porcentaje de identidad entre las dos secuencias.

En determinados ejemplos, los virus de la BI aislados se derivan de un virus similar a QX-BI que tiene una proteína S1 con la misma secuencia de aminoácidos que la de la proteína S1 de los virus similares a QX-BI, L-1148 (SEQ ID NO: 2), 1449-2 (SEQ ID NO: 3) o 1449-10 (SEQ ID NO: 4). En la Tabla 3 se muestran las secuencias de aminoácidos de las proteínas S1 de estas cepas:

Tabla 3: Secuencias de aminoácidos de las proteínas S1 de virus ejemplares similares a QX - BI.

Cepa similar a QX-BI	Secuencia de aminoácidos del Gen S1
L-1148	MLVKSFLVLTILCALCSANLFDSDNNYVYYYQSAFRPPNGWHLQGG AYAVVNSTNYTNNAGSAHECTVGVIKDVYNQSVASIAMTAPLQGMA WSKSQFCSAHCNFSEITVFVTHCYSSGSGSCPITGMIPRDHIRISAM KNGSLFYNLTVSVSKYPNFKSFQCVNNFTSVYLNGLVFTSNKTTD VTSAGVYFKAGGPVNYSIMKEFKVLAYFVNGTAQDVVLCDNSPKGL LACQYNTGNFSDGFYPFTNSTLVREKFIVYRESSVNTTLALTNFTFT NVSNAQPNSGGVNTFHLVYQTQTAQSGYYNFNLSFLSQFVYKASDF MYGSYHPSCSFRPETINSGLWFNSLSVSLTYGPLQGGCKQSVFSG KATCCYAYSYKGPMAKGVYSGELSTNFECGLLVYVTKSDGSRIQT RTEPLVLTQYNNITLDKCVAYNIYGRVGGFITNVTDAAANFSYL ADGGLAILDTSGAIDVFVQGIYGLNYYKVNPCEDVNQQFVSSGGNI VGILTSRNETGSEQVENQFYVKLNTSSHRRRRSIGQNVTSQPYVSY GRFCIEPDGSLKMIVPEELKQFVAPLLNITESVLIPNSFNLTVPFRN (SEQ ID NO:2)

(continuación)

Cepa similar a QX-BI	Secuencia de aminoácidos del Gen S1
1449-2	MLVKSLFLVTILCALCSANLFDSDNNYVYYYQSAFRPPNGWHLQGG AYAVVNSTNYTNNAGSAHGCTVGVIKDVYNQSVASIAMTAPLQGM AWSKSQFCSAHCNFSEITV FVTHCYSSGSGSCPITGMIPRDHIRISA MKNGLFYNLTVSVSKYPNFKSFQCVNNFTSVYLNGLDLVFTSNKTT DVTSAGVYFKAGGPVNYSIMKEFKVLAYFVNGTAQDVILCDNSPKG LLACQYNTGNFSDGFYPTNSTLVREKFIVYRESSVNTTLALTNFTF TNVSNAPNSGGVNTFHLYQTQTAQSGYVNFNLSFLSQFVYKASD FMYGSYHPSCSFRPETINSLWLFNSLSVSLTYGPLQGGCKQSVFS GKATCCYAYSYGPMACKGVYSGELSTNFECGLLVYVTKSDGSRI QTRTEPLVLTQYNNITLTKCVAYNIYGRVGQGFITNVTDAAANFS YLADGGLAILDTS GAIDVFVQGIYGLNYYKVNPCEDVNQQFVVS GNIVGILTSRNETGSEQVENQFYVKLNTSSHRRRRSIGQNVTS VSYGRFCIEPDGSLKM (SEQ ID NO:3)
1449-10	MLVKSLFLVTILCALCSANLFDSDNNYVYYYQSAFRPPNGWHLQGGAYAVVNSTNY TNNAGSAHECTVGVIKDVYNQSVASIAMTAPLQGM AWSKSQFCSAHCNFSEITV FV THCYSSGSGSCPITGMIPRDHIRISAMKNGLFYNLTVSVSKYPNFKSFQCVNNFTS VYLNGLDLVFTSNKTTDVTSAGVYFKAGGPVNYSIMKEFKVLAYFVNGTAQDVILCDN SPKGLLACQYNTGNFSDGFYPTNSTLVREKFIVYRESSVNTTLALTNFTFTNVSN APNSGGVNTFHLYQTQTAQSGYVNFNLSFLSQFVYKASDFMYGSYHPSCSFRPETI NSGLWLFNSLSVSLTYGPLQGGCKQSVFSGKATCCYAYSYGPMACKGVYSGELST NFECGLLVYVTKSDGSRIQTRTEPLVLTQYNNITLTKCVAYNIYGRVGQGFITNV DAAANFSYLADGGLAILDTS GAIDVFVQGIYGLNYYKVNPCEDVNQQFVVS GNIVGILTSRNETGSEQVENQFYVKLNTSSHRRRRSIGQNVTS VSYGRFCIEPDGSLKMIVPEELKQFVAPLLN (SEQ ID NO:4)

Los virus de la BI aislados de la presente invención y como se desvela el presente documento también pueden producirse por expertos habituales en la materia usando procedimientos recombinantes o "genéticos inversos". Por ejemplo, Casais y col. (2003) *J. Virol.* 77:9084-9089, describen la construcción de un virus recombinante de la BI que expresa un gen espiga heterólogo. (Véase también Hodgson y col. (2004) *J. Virol.* 78:13804-13811). El sistema implica el uso de un clon infeccioso del virus de la BI, es decir, un ADNc del virus de la BI, de longitud completa, clonado en un vector tal como, por ejemplo, un vector viral de vacuna. (Véase, por ejemplo, Casais y col. (2001) *J. Virol.* 75:12359-12369). Comenzando con un clon infeccioso del virus de la BI, pueden construirse virus recombinantes de la BI que expresen la proteína S1 de cualquiera de los otros virus de la BI. Por lo tanto, usando el sistema de Casais y col, o variantes del mismo, pueden fabricarse fácilmente virus recombinantes de la BI que expresen la proteína S1 de cualquiera de los virus similares a QX-BI (es decir, una proteína S1 codificada por una secuencia de polinucleótidos que tiene al menos una identidad del 95 % con la SEQ ID NO: 1), produciendo por lo tanto virus recombinantes similares a QX-BI. Los virus recombinantes similares a QX-BI producidos de esta manera, pueden usarse de la misma manera que se usan los virus similares a QX-BI obtenidos de manera natural (por ejemplo, aislados en el sitio), como se describe con detalle en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, "porcentaje de identidad" significa que el porcentaje de nucleótidos en una secuencia de nucleótidos de referencia es idéntico a los nucleótidos en la secuencia objeto (o una parte específica de la misma) después de alinear las secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia, como se genera mediante el programa WU-BLAST-2.0a19 (Altschul y col. (1997) *J. Mol. Biol.* 215:403-410; en lo sucesivo en el presente documento denominado "BLAST") con todos los parámetros de búsqueda establecidos a valores por defecto. Un valor de porcentaje de identidad de una secuencia de nucleótidos se determina por el número de nucleótidos idénticos emparejados dividido por la longitud de secuencia para la cual se indica el porcentaje de identidad.

Aunque en la técnica se conocen virus similares a QX-BI, virus de la BI que deriven de virus similares a QX-BI no se han descrito ni sugerido en la técnica y son, por lo tanto, el objeto de la presente invención. Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado de", en relación con un virus de la BI, significa que el virus de la BI es: (1) un descendiente procedente de pases en serie de un virus similar a QX-BI; o (2) un virus similar a QX-BI que se ha sometido a condiciones que inactivan el virus o le hacen menos virulento. Un virus "derivado de" un virus similar a QX-BI puede, por lo tanto, estar atenuado/vivo o inactivado/destruido.

Como se ha indicado anteriormente, un virus de la BI derivado de un virus similar a QX-BI, en determinadas realizaciones, es un descendiente procedente de pases en serie de un virus similar a QX-BI. Un "descendiente procedente de pases en serie de un virus similar a QX-BI", como se define en el presente documento, es un virus que se obtiene después de que un virus similar a QX-BI se propague en un medio conductor para la replicación del virus, se elimine de dicho medio y, después, se propague al menos un tiempo adicional en el mismo medio o similar. Cada ciclo de propagación y de eliminación se considera un solo "pase". Un descendiente procedente de pases en serie, de un virus similar a QX-BI, está preferentemente atenuado; por ejemplo, la atenuación es el resultado de la realización de pases en serie.

Un procedimiento ejemplar de virus de la BI procedentes de pases en serie (incluyendo virus similares a QX-BI) implica el uso de huevos, de aves de corral domésticas (por ejemplo pollos), en estado embrionario como el medio conductor para la replicación del virus. Por ejemplo, los huevos de pollo en estado embrionario se inoculan con una cantidad de virus similares a QX-BI a través de la cavidad alantoidea. Los huevos inoculados se incuban, por ejemplo, a 37°C durante 24 horas (o en otras condiciones, tiempos y temperaturas de incubación adecuadas). El líquido alantoideo se recoge de los huevos. En este punto, el virus se ha sometido a un pase "1X". Después, el líquido alantoideo recogido en este primer pase, a la dilución apropiada, se inocula en nuevos huevos en estado embrionario, que se incuban, por ejemplo, a 37°C durante 24 horas y el líquido alantoideo se recoge de este segundo grupo de huevos. En este punto, el virus se ha sometido a dos pases "2X". El pase continuado de esta manera puede proseguir de manera indefinida. Los medios conductores alternativos, para la replicación del virus, que pueden usarse para realizar pases de virus de la BI incluyen, por ejemplo, cultivos de células, tales como, cultivos de células de riñón de pollo o cultivos de fibroblastos embrionarios de pollo.

Aunque en el presente documento se ha mencionado una incubación a 37°C durante 24 horas, como una etapa de incubación ejemplar para la realización de pases de virus de la BI, un experto habitual en la materia entenderá que pueden usarse otras temperaturas y/o tiempos de incubación. Por ejemplo, pueden incubarse huevos en estado embrionario a temperaturas que varían de 20°C a 42°C. El tiempo de incubación, para realizar pases de virus, puede variar de 4 horas a 4 días, más preferentemente de 16 a 36 horas.

Para determinar el grado de virulencia, después de cada pase (o después de cada 2º, 4º, 5º, 10º, etc. pase), pueden ensayarse muestras de virus. El grado de virulencia puede determinarse, por ejemplo, administrado a pollos el virus al cual se le han realizado los pases y evaluando diversos parámetros indicativos de bronquitis infecciosa. Los parámetros ejemplares incluyen: (i) actividad ciliar de explantes traqueales; (ii) indicios clínicos, tales como, por ejemplo, exudados acuosos oculares o nasales, respiración jadeante o diarrea; (iii) reconocimiento patológico general de, por ejemplo, vías respiratorias superiores, riñones, bazo y/o intestino; y (iv) histología de la tráquea, pulmón y riñón. En el Ejemplo 2, más adelante, se presentan las mediciones ejemplares de cada uno de estos parámetros. Se considera que un virus de la BI, derivado de un virus similar a QX-BI, por pases en serie, está "atenuado" si se reduce, se elimina o mejora uno o más de los parámetros indicativos de bronquitis infecciosa, en relación con los parámetros correspondientes observados en pollos que están infectados por el virus similar a QX-BI parental (que no ha experimentado pases). También puede realizarse una comparación de pollos infectados con otras cepas virulentas conocidas del virus de la BI.

En el Ejemplo 2 se ilustra un procedimiento ejemplar para evaluar la virulencia de un virus de la BI sometido a pases en serie, derivado de un virus similar a QX-BI. Resumiendo, pollos a los que se les había inoculado un virus de la BI, sometido a pases en serie, derivado de un virus similar a QX-BI proporcionaron una puntuación numérica que reflejaba (i) actividad ciliar de explantes traqueales, (ii) indicios clínicos, y (iii) reconocimiento patológico. Se determinó la puntuación total [(i) + (ii) + (iii)]. Las clasificaciones de virulencia se establecieron de la siguiente manera:

- "Sin Virulencia", si la puntuación total es menor que o igual a la puntuación total de un grupo de control no expuesto;
- "Leve", si la puntuación total es mayor que la puntuación total de un grupo de control no expuesto pero menor que o igual a la puntuación total para un grupo expuesto con una cepa leve conocida de un virus de la BI (por ejemplo, POULVAC BI H120 (cepa de Massachusetts), Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA).
- "Virulencia moderada", si la puntuación total es mayor que la puntuación total para un grupo expuesto con una cepa leve conocida de virus de la BI pero menor que o igual a la puntuación total para un grupo expuesto con una cepa virulenta conocida de virus de la BI (por ejemplo, la cepa parental similar a QX-BI u otra cepa virulenta conocida tal como la cepa IB-M41).

- "Virulento", si la puntuación total es igual a o mayor que la puntuación total para un grupo expuesto con una cepa virulenta conocida del virus de la BI.

Un virus de la BI que, de acuerdo con el esquema de clasificación anterior, se clasifica como "No Virulento" o "Leve", es adecuado como una cepa para una vacuna viva atenuada. En determinadas circunstancias, un virus de la BI de "Virulencia Moderada" también puede ser útil como una cepa atenuada viva.

En la técnica se conocen procedimientos alternativos para evaluar la idoneidad de un virus similar a QX-BI sometido a pases en serie como una cepa para vacunas y se ilustra en cualquier parte del presente documento, por ejemplo, en el Ejemplo 3. Como se muestra en el Ejemplo 3, las puntuaciones de los cilios y de la morfología del riñón y la tráquea se usan para determinar el grado de atenuación después de múltiples pases. Estos parámetros pueden, a su vez, usarse para determinar si una cepa determinada es adecuada (por ejemplo, suficientemente segura) para fines de vacunas.

Como se ha indicado anteriormente, la otra categoría del virus de la BI que "deriva de" un virus similar a QX-BI, es un virus similar a QX-BI que se ha sometido a condiciones que inactivan el virus o le hacen menos virulento. A diferencia de los virus de la BI, sometidos a pases en serie, que están típicamente vivos y atenuados, los virus de la BI dentro de esta segunda categoría se contemplan típicamente como inactivados o destruidos. En la técnica se conocen procedimientos para inactivar virus, incluyendo virus de la BI.

Por tanto, como ilustra el análisis anterior, un virus de la BI de la presente invención que deriva de un virus similar a QX-BI está atenuado. Los virus de la BI de la presente divulgación pueden inactivarse poniendo en contacto los virus con un compuesto inactivador, tal como, por ejemplo, β -propiolactona o formalina. Los virus de la BI de la presente invención pueden atenuarse realizando pases en serie, comenzando con la realización de un pase inicial de un virus similar a QX-BI. Los virus de la BI pueden someterse a pases en cualquier medio conductor para la replicación viral. Dichos medios incluyen, por ejemplo, huevos de aves de corral domésticas en estado embrionario. Los huevos de aves de corral domésticas en estado embrionario incluyen, por ejemplo, huevos de pollo en estado embrionario tales como huevos de pollo sin patógenos específicos (SPE). Otros medios adecuados incluyen, por ejemplo, cultivos de células.

Para atenuar los virus de la BI desvelados en el presente documento, los virus pueden someterse a pases varias veces. En determinadas realizaciones, los virus se someten a pases al menos las veces suficientes para que los virus resultantes se caractericen por ser "No Virulentos", "Leves" o (en determinadas circunstancias) "Virulentos Leves", usando la metodología de clasificación indicada en cualquier parte del presente documento. En determinados ejemplos, los virus de la BI desvelados en el presente documento se someten a pases entre 5 y 400 veces. Por ejemplo, si fuera necesario o se deseara, los virus de la BI pueden someterse a pases 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 205, 210, 215, 220, 225, 230, 235, 240, 245, 250, 255, 260, 265, 270, 275, 280, 285, 290, 295, 300, 305, 310, 315, 320, 325, 330, 335, 340, 345, 350, 355, 360, 365, 370, 375, 380, 385, 390, 395, 400 veces o más.

Los virus de la BI de la presente invención están aislados. Como se usa en el presente documento, el término "aislado" significa que los virus no están dentro de un tejido de un animal vivo.

La presente invención incluye diversas muestras de trabajo de virus de la bronquitis infecciosa aislados derivados de virus similares a QX-BI. Por ejemplo, el virus L-1148, similar a QX-BI, se ha sometido a pases 64 veces en huevos de pollo, de 10-11 días, sin patógenos específicos (SPE) en estado embrionario. Para realizar el pase 65, los huevos SPE se inocularon con 0,2 ml de una dilución 1000 veces de líquido alantoideo procedente del pase del nivel 64. Después de 24 horas de incubación a 37°C, el líquido alantoideo se recogió en grupos. El material sometido a 65 pases se denomina en el presente documento L-1148(p65) (véase el Ejemplo 3). Se seleccionaron grupos estériles de L-1148(p65), se agruparon, se mezclaron con un estabilizador, se cargaron en viales de 3 ml (1 ml por vial) y se liofilizaron para preparar virus de semillas maestras VSM65 L1148 de QX-BI. Se realizaron 15 pases adicionales, para un total de 80 pases, para producir L-1148(p80) (véase Ejemplo 3). Del mismo modo que se hizo con el material sometido a 65 pases, el líquido alantoideo del pase 80 se recogió en grupos. Se seleccionaron grupos estériles, se agruparon, se mezclaron con estabilizador, se cargaron en viales de 3 ml (1 ml por vial) y se liofilizaron para preparar virus de semillas maestras VSM80 L1148A de QX-BI. Cada uno de VSM65 L1148 y VSM80 L1148A de QX se sometieron a pases cinco veces más para producir VSM65 X+5 L1148A y VSM80 X+5 L1148A, respectivamente, de QX-BI.

El VSM65 L1148 de QX-BI, se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células, Porton Down, UK (CECC) el 10 junio del año 2009, con el nombre Fort Dodge Animal Health, y se le asignó el número de acceso provisional 09061002.

El VSM80 L1148A de QX-BI, se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células, Porton Down, UK (CECC) el 10 junio del año 2009, con el nombre Fort Dodge Animal Health, y se le asignó el número de acceso provisional 09061004.

El VSM65 x+5 L1148A de QX-BI, se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células, Porton Down, UK

(CECC) el 10 junio del año 2009, con el nombre de Fort Dodge Animal Health, y se le asignó el número de acceso provisional 09061003.

5 El VSM80 x+5 L1148A de QX-BI, se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células, Porton Down, UK (CECC) el 10 junio del año 2009, con el nombre de Fort Dodge Animal Health, y se le asignó el número de acceso provisional 09061001.

Ejemplos adicionales de virus IB, derivados de virus similares a QX-BI, se describen en cualquier parte del presente documento.

10 Las composiciones de vacuna de la presente invención comprenden: (i) un virus de la BI aislado derivado de un virus similar a QX como se describe anteriormente; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser, por ejemplo, agua, un estabilizador, un conservante, un medio de cultivo, o un tampón, o cualquier combinación de los anteriores. Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden prepararse en forma de una suspensión o en una forma liofilizada o, como alternativa, en una forma congelada. Si se preparan congeladas, para potenciar la estabilidad durante la congelación, puede añadirse glicerol u otros agentes similares.

15 Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden comprender un adyuvante. El adyuvante puede ser un polímero acrílico, bromuro de dimetil dioctadecil amonio (DDA) o una combinación de un polímero acrílico y DDA. Un polímero acrílico, como se usa en el presente documento, es cualquier polímero o copolímero que contiene un resto acrílico. Los polímeros acrílicos ejemplares incluyen, por ejemplo, ácido poliacrílico, ácido metacrílico, metacrilato, acrilamida, acrilato, acrilnitrilo y ésteres de alquilo de ácido poliacrílico. Los ejemplos de copolímeros acrílicos incluyen, por ejemplo, poli (acrilamida-cobutilo, metacrilato), ácido acrílico-metacrílico, acrílico-acrilamida y poli (metacrilato). Los ejemplos de polímeros acrílicos disponibles en el mercado incluyen, Carbopol (B. F. Goodrich Co., Cleveland, Ohio), Carboset, (B. F. Goodrich Co., Cleveland, Ohio), Neocryl (Avecia, Inc., Wilmington, Del.), y Eudragit (Rohm Tech, Inc., Malden, Mass.). Un polímero acrílico, particularmente preferido, para su uso en las emulsiones de la presente invención es Carbopol, denominado también polímero hidrosoluble de ácido acrílico reticulado con polialil sacarosa. El adyuvante puede ser un adyuvante hidrosoluble o dispersable en agua. El adyuvante puede ser una emulsión oleosa, por ejemplo, agua en aceite, aceite en agua, o una emulsión de agua en aceite en agua. Una emulsión de agua en aceite puede incluir adicionalmente uno o más tensioactivos liposolubles, uno o más tensioactivos hidrosolubles, adyuvantes adicionales, componentes en fase acuosa adicionales, estabilizadores de emulsión o combinaciones de los mismos.

30 Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden comprender, además de un virus de la BI derivado de un virus similar a QX-BI de acuerdo con la presente invención, otros componentes antigénicos. Los otros componentes antigénicos incluidos en las composiciones de vacuna pueden derivar de agentes infecciosos, por ejemplo, agentes infecciosos de pollos. Por ejemplo, las composiciones de vacuna de la presente invención pueden comprender adicionalmente al menos un virus adicional de la BI vivo atenuado derivado de un virus no similar a QX-BI. Como se usa en el presente documento, "virus no similar a QX-BI" se refiere a cualquier virus de la BI con una proteína S1 codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad menor del 95 % con la secuencia nucleótidos que codifica la proteína S1 de la cepa de QX-BI original. La secuencia nucleótidos que codifica la proteína S1 de la cepa de QX-BI original se representa por la SEQ ID NO:1 y está disponible con el n° de acceso AF193423 de Genbank del CNIB. Por tanto, cualquier virus con una proteína S1 codificada por una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad menor del 95 % con la SEQ ID NO:1 es un virus "no similar a QX-BI" para los fines de la presente invención. Los virus ejemplares no similares a QX-BI incluyen cepas tales como Massachusetts, Arkansas, Georgia-98, Italy-02, 793-B, D274, D1466, o cepas que tienen el genotipo S1 de cualquiera de los virus anteriores no similares a QX-BI. Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden contener una o más cepas de vacuna de la BI disponibles en el mercado además de un virus de la BI derivado de un virus similar a QX-BI.

50 En determinadas realizaciones de la presente invención, la composición de vacuna puede contener un componente antigénico adicional derivado de un agente infeccioso que no es un virus de la BI. Por ejemplo, las composiciones de vacuna de la presente invención pueden comprender adicionalmente un virus aviar vivo atenuado o inactivado tal como el virus de la enfermedad de Newcastle, el virus de la enfermedad de Marek's, el virus de la bursitis infecciosa, reovirus, virus de la gripe aviar, el virus de la anemia del pollo o el virus de la encefalomiелitis aviar.

55 En el presente documento también se describen procedimientos para preparar virus de la BI atenuados vivos. Los virus atenuados vivos preparados de acuerdo con este procedimiento son útiles, entre otras cosas, para vacunar a pollos contra el virus de la BI. Los procedimientos comprenden realizar pases de un virus similar a QX-BI. Por ejemplo, un virus similar a QX-BI puede someterse a pases en huevos de aves de corral en estado embrionario (por ejemplo, huevos del pollo en estado embrionario) o en cultivos de células (por ejemplo, cultivos de células de riñón de pollo). El número de veces que un virus similar a QX-BI debe someterse a pases para atenuarlo puede determinarse basándose en los contenidos expuestos en el presente documento. Por ejemplo, después de la realización de pases de un virus similar a QX-BI, el virus resultante de la BI puede administrarse a los pollos y estos, después, evaluarse para determinar, por ejemplo, la actividad ciliar de explantes traqueales, indicios clínicos, indicios patológicos y/o histológicos generales de bronquitis infecciosa. Un virus de la BI, sometido a pases, que produce

señales reducidas o menos graves de BI en comparación con el virus similar a QX-BI parental, del cual deriva, (o en comparación con otras cepas de BI de referencia conocida) se considera una cepa atenuada, para los fines de la presente invención. Los procedimientos comprenden realizar pases de un virus similar a QX-BI hasta que el virus resultante se categorice como "No Virulento" o "Leve" de acuerdo con la metodología de categorización expuesta en cualquier parte del presente documento.

Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden administrarse de cualquier manera tal que los componentes activos o antigénicos se pongan, inmediata o eventualmente, en contacto con las membranas mucosas respiratorias del ave. Por tanto, la composición de vacuna puede administrarse a aves, por ejemplo, por vía intranasal, oral y/o intraocular. Las composiciones de vacuna para la administración aviar pueden formularse como se ha descrito anteriormente y/o en una forma adecuada para la administración por pulverización, incluyendo en aerosol (por administración intranasal) o en agua potable (por administración oral). Las composiciones de vacuna de la presente invención también pueden administrarse subcutáneamente, intramuscularmente o en el huevo. (Véase la patente de Estados Unidos N° 7.208.164). Las composiciones de vacuna de la presente invención que comprenden un virus de la BI derivado de un virus similar a QX-BI pueden administrarse a un ave desde el primer día que nace hasta las 18 semanas. Si se administran en el huevo, la composición de vacuna puede administrarse, por ejemplo, en la última mitad del periodo de incubación. Por ejemplo, en el caso de pollos, los huevos se inoculan generalmente desde aproximadamente el día 12 de incubación a aproximadamente el día 20 de incubación. Preferentemente, la inoculación se produce desde entre el día 14 a aproximadamente el día 19. Más preferentemente, los huevos de pollo se inoculan aproximadamente el día 15-18.

Los siguientes ejemplos son ilustrativos del procedimiento y composiciones de la presente invención.

Ejemplos

Ejemplo (de referencia) 1: IDENTIFICACIÓN DE VIRUS SIMILARES A QX-BI

Este ejemplo proporciona un procedimiento para determinar si un virus de la BI candidato es un virus similar a QX-BI. Pueden obtenerse virus de la BI candidatos a partir de una diversidad de fuentes que incluyen, por ejemplo, frotis de tejidos de animales, que presentan uno o más síntomas de bronquitis infecciosa, o de un depósito público.

Como se usa en el presente documento, un "virus similar a QX-BI" es un virus de la bronquitis infecciosa con una secuencia de nucleótidos S1 que tiene una identidad de al menos un 95 % con la secuencia de nucleótidos S1 de la cepa de QX-BI identificada originalmente. La secuencia de nucleótidos S1 de la cepa QX-BI original es la SEQ ID NO:1 y puede encontrarse con el n° AF193423 de referencia de Genbank del CNIB.

Para determinar si un virus candidato es un virus similar a QX-BI, se aísla ARN de una muestra que contiene las partículas virales candidatas (por ejemplo, frotis de tejidos) usando procedimientos de aislamiento de ARN convencionales. Por ejemplo, puede extraerse ARN usando el procedimiento isotiocianato de guanidío, fenol-cloroformo. (Chomczynski y Sacchi (1987), *Analytical Biochemistry* 162:156-159; Li y col. (1993), *Avian Pathology* 22:771-783). Además, en el mercado existen diversos kits disponibles para el aislamiento de ARN y son adecuados para este fin. Después, el ARN se usa en una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) para generar una copia de ADN amplificado del gen S1 completo o la denominada "región hipervariable" del gen S1. Los cebadores usados en la RT-PCR son preferentemente aquellos que son comunes para las cepas más conocidas del virus de la BI. Los cebadores ejemplares, junto con los procedimientos de RT-PCR correspondientes que pueden usarse para amplificar la región hipervariable del gen S1 de los virus de la BI candidatos se exponen, por ejemplo, en Worthington y col. (junio 2008), *Avian Pathology* 37:247-257, y Jones y col. (2005), *Veterinary Record* 156:646-647. En Worthington y col., después de la reacción RT, se realiza una PCR anidada, para producir una copia de ADN de la región hipervariable de S1 que tiene aproximadamente 393 pares de bases. La secuenciación de S1 de longitud completa puede realizarse usando el procedimiento de Adzhar y col. (1996), *Avian Pathology* 25:817-836. Expertos habituales en la materia pueden diseñar fácilmente cebadores alternativos y condiciones de RT-PCR adecuados para amplificar el gen S1 o partes del mismo, usando información de secuencias disponibles públicas para virus de la BI.

Después de determinar la secuencia de nucleótidos de todo el gen S1, o parte del mismo (por ejemplo, la región hipervariable), del virus de la BI candidato, la secuencia se compara con la secuencia del gen S1 de la cepa de QX-BI (SEQ ID NO:1) para determinar el porcentaje de identidad. Si la secuencia nucleótidos del gen S1, o la región hipervariable del mismo, del virus de la BI candidato, tiene al menos una identidad del 95 % con la secuencia de nucleótidos del gen S1 de QX-BI (SEQ ID NO:1), se considera que el virus de la BI candidato es un virus similar a QX-BI.

Procedimientos ejemplares para determinar si un virus de la BI candidato es un virus similar a QX-BI, también se describe, por ejemplo, en Gough y col. (2008), *Veterinary Record* 162:99-100, y Domanska-Blicharz y col. (2006), *Veterinary Record* 158:808.

Ejemplo (de referencia) 2: ATENUACIÓN DE LOS VIRUS SIMILARES A QX-BI

INTRODUCCIÓN

Este ejemplo resume experimentos en los cuales virus similares a QX-BI se someten a pases múltiples veces en huevos de pollo en estado embrionario y la atenuación de los virus resultantes se demostró en pollos.

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

Virus de la Bronquitis Infecciosa

5 En este ejemplo, se usaron tres cepas de virus similares a QX-BI, denominadas L-1148, 1449-2, y 1449-10. Estas tres cepas se identificaron como similares a QX-BI por secuenciación del gen S1 y por comparación de nucleótidos con QX-BI y otros virus similares a QX-BI. (Véase Worthington y col. (junio 2008), *Avian Pathology* 37:247-257).

10 Cada una de las cepas L-1148 y 1449-10 se sometieron 50 veces a pases en huevos de pollo en estado embrionario; la cepa 1449-2 se sometió 5 veces a pases en huevos de pollo en estado embrionario. Las cepas obtenidas de estos pasos múltiples se denominaron L-1148(p50), 1449-10(p50), y 1449-2(p5), respectivamente. Por tanto, L-1148(p50) derivó de L-1148; 1449-10(p50) derivó de 1449-10; y 1449-2(p5) derivó de 1449-2.

Diseño del estudio

15 Los pollos se expusieron a los virus L-1148(p50), 1449-10(p50), y 1449-2(p5), junto con cepas conocidas de la BI, leve (cepa de vacuna, IB-H120) y virulenta (IB-M41). En este estudio también se incluyó un grupo de control no expuesto. En la Tabla 4 se resume el diseño del estudio:

Tabla 4: Diseño del Estudio.

Grupo	Nº. de pollos	Cepa expuesta
1	10	L-1148(p50)
2	10	1449-10(p50)
3	10	1449-2(p5)
4	10	IB-H120
5	10	IB-M41
control	10	No expuesta

Animales y cría de animales

20 En este ejemplo se usaron sesenta pollos SPE. A los 15 días de edad, se dividieron 50 pollos en cinco grupos (1-5) y se alojaron en aisladores. Los 10 pollos que se usaron como control permanecieron en su corral. Para la aclimatación, los pollos que se habían trasladado a aisladores se dejaron solos durante tres días. Los pollos disponían de agua y alimento a discreción. Durante el estudio, se observaron los indicios clínicos de la BI en todos los pollos.

25 Administración de virus

Usando una jeringa de 1 ml, se expusieron 5 pollos, en una hilera, al virus de la BI, administrando 0,1 ml en cada ojo de cada pollo. En el caso de IB-M41 los pollos recibieron 0,25 ml en cada ojo. Todos los pollos se expusieron aproximadamente a una DIH_{50} de $10^{6.0}$ virus de la BI, a los 18 días de edad. Se conservaron reservas de virus a -70 °C y se diluyeron en caldo nutritivo a la concentración apropiada antes de la administración.

30 Inmediatamente después de administrar los virus a los pollos, una muestra del virus usado se conservó en un frasco estéril a -70 °C para la re-titulación.

Actividad ciliar de Explantos Traqueales

35 Cuatro días después de la exposición, se examinó la actividad ciliar de los explantes traqueales. Los pollos se inmovilizaron con una mezcla gaseosa de O₂ al 34 % y CO₂ al 66 %. Cuando se alcanzó un estado completo de anestesia, los pollos se sacrificaron por inhalación con CO₂ al 100 %. Inmediatamente después de la muerte se extrajo la tráquea (desde la base de la cabeza a una distancia de 0,5 cm desde la siringa). Inmediatamente después de la extracción de la tráquea, esta se aclaró con PBS a 37°C usando una jeringa sin aguja y se conservó en PBS a 37 °C hasta procesamiento posterior. Se realizaron secciones transversales de 0,6 mm de la tráquea usando un cortador de tejidos Mcllwain (Mickle Laboratory Engineering Co. Ltd., Surrey, Reino Unido). Las secciones transversales de la tráquea se pusieron con 2 ml de PBS a 37 °C en una placa de Petri y se examinaron al microscopio en 4 minutos. Se examinó la actividad ciliar de 3 secciones de la parte superior, 4 secciones de la parte media y 3 secciones de la parte inferior de la tráquea con un microscopio de bajo aumento (400x). La actividad ciliar de cada sección traqueal se examinó a los 20 minutos después del sacrificio del pollo.

La actividad ciliar se puntuó en una escala de 0 (100 por cien de actividad ciliar) a 4 (0 por ciento de actividad ciliar). Después, para cada grupo se calculó la ciliostasis promedio, dividiendo la suma de las secciones traqueales que mostraron cese entre el número de pollos por grupo. La ciliostasis promedio calculada por grupo se comparó con la ciliostasis promedio de los grupos expuestos a Poulvac BI 120 y BI-M41 y con el grupo no vacunado. BI-M41 se clasificó como virulento y el virus de la BI en Poulvac BI H120 como leve.

5

Indicios clínicos

Durante el estudio, especialistas en animales, observaron diariamente a las aves para determinar indicios clínicos. Los indicios clínicos atribuidos a infección por BI se puntuaron de la siguiente manera:

Indicio Clínico Observable	Puntuación	
	Ausente	Presente
Exudados acuosos oculares o nasales	0	2
Respiración jadeante	0	4
Diarrea	0	1

10 Reconocimiento Patológico General

Se realizó la necropsia a cada pollo para determinar cualquier anomalía que pudiera ser consecuencia de infección de BI. Las desviaciones se puntuaron de la siguiente manera:

- Vías respiratorias superiores: aspecto normal = 0, mucus = 1; bronquitis/traqueítis = 2.
- Riñones: aspecto normal = 0; inflamados o amarillentos con cristales de urato = 1.

15

- Bazo: aspecto normal = 0; inflamado = 1.
- Intestino: aspecto normal = 0; anomalías = 2.

Histología de la Tráquea, Pulmón y Riñón

20 Se tomaron muestras de tráquea, pulmón y riñón 4 días después de la administración de los virus. Todas las muestras se sometieron a examen histológico. Para detectar el VBI se aplicó tinción inmunohistoquímica en el epítipo del VBI 48.4 (una nucleoproteína).

Evaluación

La virulencia de los virus de la BI en pollos SPE se determinó mediante:

- La actividad ciliar de explantes traqueales;
- La presencia y gravedad de indicios clínicos; y
- Anomalías observadas en el examen patológico

La virulencia del VBI en pollos SPE se clasificó como:

- No virulento, si la puntuación total del grupo es menor que o igual a la puntuación total del grupo no expuesto;
- Leve, si la puntuación total del grupo es mayor que la puntuación total del grupo de control y menor que o igual a la puntuación total del grupo expuesto a Poulvac BI H120;
- Virulencia moderada, si la puntuación total del grupo es mayor que la puntuación total del grupo expuesto a Poulvac BI H120 y menor que o igual a la puntuación total del grupo expuesto a BI M4;
- Virulento, si la puntuación total del grupo es igual o mayor que la puntuación total del grupo expuesto a IB-M41.

35 El ensayo no se consideró válido si más del 10 por ciento de los pollos mueren por causas no atribuibles al virus de la vacuna. En este ejemplo, el virus de la vacuna se consideró suficientemente inocuo si:

- Ningún pollo mostró indicios clínicos destacables de bronquitis infecciosa aviar o murió por causas atribuibles al virus de la vacuna.

- La puntuación de ciliostasis promedio no era superior a 25; y
- Se observaban lesiones inflamatorias a lo sumo moderadas durante el examen histológico del riñón.

Sin embargo, los virus que se clasificaron como virulentos moderados o virulentos y que no cumplían con los requisitos anteriormente mencionados, eran posiblemente adecuados para su uso como un virus para la exposición.

5 **RESULTADOS**

Titulación de los Virus de la BI Después de la Administración en Pollos

En la Tabla 5 se muestran las titulaciones de los diferentes virus de la BI después de exponer a los pollos. Como se muestra en esta tabla, en todos los casos, los pollos se expusieron a virus de la BI a una DIH₅₀ superior a 10^{6.0}.

Tabla 5: Titulaciones de VBI después de la administración en pollos.

Grupo	Virus	Titulación en 10log de DIH ₅₀ por ml o por vial		
		Muestra 1	Muestra 2	Promedio
1	L-1148(p50)	6,83	6,67	6,75
2	1449-10(p50)	7,00	6,33	6,67
3	1449-2(p5)	6,50	6,67	6,59
4	IB-H120	6,33	6,00	6,17
5	IB-M41	6,50	7,33	6,92

10

Indicios clínicos, Actividad Ciliar y Examen Patológico

Ningún pollo murió durante el estudio. En algunos pollos expuestos a 1449-10(p50) BI solo se observó secreción exudativa oculonasal muy leve (pequeñas gotas en el orificio nasal) y jadeo respiratorio después tratar a los pollos.

15 No se observó ciliostasis en ninguno de los pollos de control, pero se demostró claramente en los pollos expuestos a BI-M41. Tres de los 10 pollos expuestos a Poulvac BI H120 mostraron ciliostasis completa. El número de secciones traqueales con ciliostasis aumentaba si los pollos se exponían a VBI 1148(p50) (6 secciones), VBI 1449-2(p5) (20 secciones) y VBI 1449-10(p50) (41 secciones).

20 Durante el examen patológico de los pollos, se observó que en los pollos expuestos a 1449-2(p5) BI, Poulvac BI H120 o BI-M41 existía un exudado catarral en las tráqueas. En un pollo expuesto a 1449-2(p5) BI, se observó un riñón inflamado amarillento

Basándose en la actividad ciliar, los indicios clínicos y en hallazgos tras la muerte, resumidos en la Tabla 6, se realizó una clasificación de los virus derivados similares a QX-BI. La cepa L-1148(p50) se clasificó como leve, el VBI 1449-10(p50) como virulento moderado y el VBI 1449-2(p5) como virulento leve en comparación con Poulvac BI H120 y BI-M41. de virus de la BI después de la exposición de pollos SPE.

Grupo	Virus	Puntuación promedio de Ciliostasis	Puntuación*			Total (C+S+P)	Clasificación
			C(n)	S	P		
1	L-1148(p50)	2	24(1)	0	0	24	Leve
2	1449-10(p50)	16	164(4)	24	0	188	Virulencia moderada
3	1449-2(p5)	8	80(2)	0	5	85	Leve
4	BI-H120	12	120(3)	0	1	121	Leve
5	BI-M41	40	400(10)	0	4	404	Virulencia
6	Sin exposición	0	0(0)	0	0	0	Sin virulencia

*Las puntuaciones se basaron en:
 (C) Actividad ciliar de los explantes traqueales, (n) = número de pollos afectados; se considera que un pollo está afectado cuando al menos dos secciones traqueales muestran ciliostasis.
 (S) Indicios clínicos.
 (P) Examen patológico.

Histología de la Tráquea. Pulmones y Riñón

No se observaron anomalías en las tráqueas de los pollos expuestos a L-1148(p50), 1449-2(p5) y BI-H120. Después de la exposición a 1449-10(p50) se observó traqueítis local con necrosis en una de cuatro tráqueas. Todas las tráqueas de los pollos expuestos a BI-M41 mostraron traqueítis aguda. En las tráqueas de los pollos infectados con BI-M41, no pudo detectarse el VBI.

En los pulmones de los pollos no se observaron anomalías ni se detectó el VBI.

La histología de los riñones de los pollos expuestos a L-1148(p50) y 1449-10(p50) mostró una ligera infiltración de células mononucleares y plasmacelulares en algunos casos. El epitelio tubular no se vio afectado. Usando inmunohistoquímica no se detectaron antígenos del VBI en las células epiteliales de las muestras de los túbulos renales tomadas 4 días después de la infección. No pudo detectarse el VBI en los riñones de ninguno de los grupos después de la tinción inmunohistoquímica.

Discusión

El VBI infecta primero la mucosa traqueal y después se replica en el epitelio de otros órganos, por ejemplo células epiteliales tubulares renales y el epitelio del oviducto. La replicación del VBI en células epiteliales podría dar como resultado la degeneración de las células y posteriormente podrían producirse cambios patológicos en órganos/tejidos. Si se producen indicios clínicos, depende de diversos factores tales como la virulencia del VBI, del órgano infectado, de la aparición de infección secundaria y del estado físico general del pollo. Esto se observa en la tráquea de los pollos expuestos al VBI, en los que la actividad ciliar se modifica en todos (VBI-M41), en el 40 % (1449-10(p50)), en el 20 % (1449-2(p5)) y en el 10 % (VBI L-1148(p50)) de los animales. El exudado catarral estaba presente en las tráqueas de pollos expuestos a VBI 1449-2(p5), Poulvac BI H120 y BI-M41. Solamente cuando los pollos se expusieron al VBI 1449-10(p50) se observaron indicios clínicos leves, que parecen haber sido el resultado de ciliostasis y posteriormente la acumulación de mucus. Teniendo en cuenta que los pollos se expusieron a dosis elevadas del VBI, los resultados de este ejemplo son prometedores. La ausencia de indicios clínicos después de la exposición de los pollos al VBI L-1148(p50) y al VBI 1449-2(p5) más probablemente refleja el hecho de que los indicios clínicos causados por las correspondientes cepas de campo son leves. Solamente se observaron indicios respiratorios leves después de la exposición de pollos SPE al VBI 1449-10(p50), lo que demuestra la atenuación de esta cepa, porque la cepa de campo del VBI 1449-10 era virulenta.

Conclusión

Como se muestra en este ejemplo, los virus similares a QX-BI pueden atenuarse por pases múltiples. Las cepas atenuadas resultantes derivadas de virus similares a QX-BI muestran una gran promesa como nuevas cepas para vacunas contra la bronquitis infecciosa. Los virus sometidos a pases, derivados de virus similares a QX-BI que causan efectos virulentos moderados cuando se administran a pollos, serían útiles como material de exposición para estudiar y desarrollar adicionalmente nuevas vacunas contra la BI, especialmente vacunas contra virus similares a QX-BI.

Ejemplo 3: PASES ADICIONALES E INOCUIDAD DE LA CEPA SIMILAR A QX-BI, L-1148Introducción

En este ejemplo, la cepa del virus similar a QX-BI, L-1148, se sometió a pases en veces múltiples en huevos de pollo en estado embrionario. La inocuidad de los virus en diversos niveles de pases se evaluó midiendo el grado de ciliostasis y la morfología del riñón en pollos. Como se ilustra a continuación, la realización de pases múltiples de la cepa L-1148 dio como resultado una cepa atenuada adecuada como una vacuna contra infecciones por virus similares a QX-BI.

Realización de Pases de L-1148 en Huevos de Pollo SPE en Estado Embrionario

Para la realización de los pases de los virus, se usaron huevos de pollo sin patógenos específicos (SPE) en estado embrionario de 10 a 11 días. Inicialmente, la cepa L-1148 se sometió a pases siete veces en huevos de pollo SPE. Para los 5 primeros pases se inoculó líquido alantoideo no diluido. Los pases se realizaron solamente con líquidos alantoideos de huevos con embriones vivos. Esto produjo aproximadamente el 50 % de embriones muertos. Se decidió continuar la realización de pases con líquido alantoideo diluido 100 veces en solución salina fisiológica, produciendo menos embriones muertos. Los pases continuaron hasta el pase 73. Después de recoger el pase 73 se comenzó a saber que había una contaminación por el virus de la enfermedad de Newcastle (EN) en la cepa L-1148 de la BI. Muestras de sangre de pollos vacunados con 50 pases de la cepa L-1148 de la BI contenían anticuerpos contra un virus de EN. Análisis RT-PCR de muestras de 8 pases revelaron que la cepa L-1148 de la BI se había contaminado desde el principio con este virus. Se decidió detener la realización de pases y depurar la cepa del virus L-1148 de la BI de la contaminación.

55

Descontaminación de los Pases de L-1148

5 Se tomaron muestras de los pases 22, 47 y 73 y se trataron con antisuero específico de ND. Brevemente, se mezclaron muestras de líquido alantoideo con muestras de antisuero policlonal específico de ND en un líquido alantoideo: proporción de volumen de suero de 1:2. La mezcla se incubó a 37 °C durante una hora seguido de incubación durante una noche a 4 °C. Después de la incubación se prepararon series de dilución de 10 veces y se inocularon 5 huevos por dilución cada uno con 0,1 ml. Después de 2 días se recogió líquido alantoideo y se recuperaron muestras de la dilución más elevada que aún era positiva para la BI por RT-PCR. Los huevos con embriones muertos se desecharon. Se trató de nuevo el líquido alantoideo con antisuero ND, como se ha indicado anteriormente, y de nuevo se inocularon series en dilución en huevos. Después de la incubación, se recuperó de nuevo la dilución más elevada que aún era positiva para la BI por RT-PCR, se llenó en partes y se congeló y conservó a -70 °C.

10 El proceso de descontaminación anterior produjo pases 24, 49 y 75 depurados y clonados. Se realizó un lote a nivel del pase 25 por inoculación en huevos de una dilución de 10⁷ veces, 0,2 ml por huevo y se recogió después de 48 horas de incubación a 37 °C. El líquido alantoideo se llenó en pequeñas partes y se conservó a -70 °C. De acuerdo con el mismo procedimiento, se realizó un lote de pase 50. El pase 75 se sometió a pases hasta 80 pases adicionales. Los líquidos alantoideos del pase 80 se agruparon se cargaron en pequeñas partes y se congelaron y se conservaron a -70 °C.

Ensayo de Inocuidad

20 Se ensayó varias veces la inocuidad de diferentes niveles de pases de la cepa L-1148 de la BI. En este estudio también se incluyó la cepa similar a QX-BI no atenuada, 1449-10, junto con la cepa similar a Massachusetts virulenta, BI-M41 y la cepa de la vacuna leve Poulvac BI H120.

25 Para cada ensayo, se usaron pollos SPE de un día. Los ensayos se realizaron de acuerdo con procedimientos convencionales. Brevemente, usando una jeringa de 1 ml, 5 pollos, en una hilera, se expusieron con virus de la BI administrando a cada pollo 0,1 ml en cada ojo. En el caso de BI-M41 los pollos recibieron 0,25 ml en cada ojo. Se reconstituyeron, en agua para inyección, virus liofilizados y se prepararon diluciones adicionales en caldo nutritivo. Posteriormente, se observó diariamente a las aves para determinar los indicios clínicos.

30 Cinco días después de la administración del virus, se examinó la actividad ciliar de explantes traqueales en 5 pollos. Las tráqueas se extirparon de pollos a los que se les había realizado la eutanasia y se realizaron secciones transversales de 0,6 mm, 3 secciones de la parte superior, 4 secciones de la parte media y 3 secciones de la parte inferior de la tráquea. Las secciones transversales de la tráquea se pusieron en la una placa de Petri que contenía 2 ml de PBS a 37 °C y se examinaron al microscopio a los 4 minutos.

La actividad ciliar se puntuó microscópicamente, en una escala de 0 (100 por cien de actividad ciliar) a 4 (0 por ciento de actividad ciliar). Para cada grupo se calculó la ciliostasis promedio dividiendo la suma de las secciones traqueales que mostraban cese entre el número de pollos por grupo.

35 Se extirparon muestras de tráquea, pulmón y riñón de animales a los que se les había realizado la eutanasia. Todas las muestras se examinaron histológicamente. Para detectar el virus de la BI, se realizó tinción inmunohistoquímica para el epítipo del VBI 48,4 (una nucleoproteína).

En la Tabla 7 se resumen los resultados

Tabla 7: Resultados resumidos de ensayos de inocuidad en diferentes pases del L-1148

Estudio	Virus Ensayados	Titulación*	Puntuación Ciliar	Riñones	Tráquea
A	1449-10	5,6	39	Amarillentos, inflamados, nefritis aguda	normal
	1449-10	3,0	32	Amarillentos, inflamados, nefritis aguda	normal
	BI H120	6,0	18	Nefritis leve	normal
	L-1148(p8)	6,0	39	Amarillentos, inflamados, nefritis leve a moderada	normal
	L-1148(p25)	6,0	18	Amarillentos, inflamados, nefritis aguda	normal
	L-1148(p40)	6,0	21	Amarillos, inflamados, nefritis leve	normal
	L-1148(p50)	6,0	31	Amarillos, inflamados, nefritis leve	normal

Estudio	Virus Ensayados	Titulación*	Puntuación Ciliar	Riñones	Tráquea
	BI-M41	3,3	37	Ninguno	normal

(continuación)

Estudio	Virus Ensayados	Titulación*	Puntuación Ciliar	Riñones	Tráquea
B	BI-M41	3,3	40	Amarillentos, nefritis leve	normal
	BI H120	6,0	16	Amarillentos, nefritis leve a moderada	mucus, traqueítis
	L-1148(p25)	6,0	13	Nefritis leve a moderada	mucus, traqueítis
	L-1148(p50)	6,0	22	Nefritis leve a moderada	Traqueítis
	L-1148(p80)	6,0	3	Nefritis leve	Normal
C	L-1148(p65)	6,0	18	Ninguno	1x mucus

* Titulación expresada en log DIH₅₀ por dosis

5 Los resultados muestran que IB-M41 (cepa virulenta) tuvo una puntuación ciliar elevada; la puntuación máxima que puede alcanzarse es de 40. La cepa BI 1449-10 también tuvo una puntuación ciliar elevada. La cepa de vacuna BI H120 tuvo una puntuación baja que cumple con los requisitos reguladores (por ejemplo, menos de 25). El pase 8 de la cepa BI L-1148 tuvo una puntuación elevada de 39 en el estudio A. Hubo una fuerte disminución a 18 en el nivel del pase 25. En los niveles de los pases 40 y 50 hubo aumentos en la puntuación de ciliostasis a 31 para p50 en el estudio A. Todas las muestras de la cepa BI L-1148 ensayadas en el estudio A estaban contaminadas con un virus de la EN. Los niveles de los pases 25 y 50 se ensayaron de nuevo después de eliminar la contaminación de EN. 10 Esta vez, las puntuaciones de ciliostasis fueron claramente inferiores y dentro del intervalo aceptable para una cepa de vacuna. En el estudio B también se ensayó el pase 80. Este pase pareció proporcionar una puntuación de ciliostasis muy baja, mucho más baja que la de BI H120. Se preveía que el nivel de pase 80 pudiera atenuarse más allá de lo necesario para una cepa de vacuna inocua.

15 La tabla 7 también muestra resultados del examen de los riñones y la tráquea. La nefritis leve a moderada se consideró aceptable siempre que fuera transitoria. La traqueítis se consideró aceptable solamente si ésta era transitoria, se consideró lo mismo para el mucus en la tráquea. Los resultados muestran que los pases 8, 25, 40 y 50 de BI L-1148 afectaron a los riñones, al igual que la cepa de la vacuna de referencia BI H120, pero no tan grave como la cepa BI 1449-10. El pase 80 también tuvo algún efecto en los riñones.

20 Después de analizar los resultados de los estudios A y B, se decidió producir un lote de BI L-1148 a nivel del pase 65 (es decir, L-1148(p65)) y evaluar la inocuidad de los virus resultantes. Los pases se prepararon desde el pase 50 hasta el pase 64 inoculando huevos, cada uno con 0,1 ml, de diluciones 100 veces de los sobrenadantes agrupados de líquidos alantoideos procedentes del pase anterior, hasta el nivel del pase 64. Se produjo un gran lote en el nivel de pase 65, bajo GMP. Los huevos se inocularon cada uno con 0,2 ml de una dilución 1000 veces de líquido alantoideo del nivel de pase 64. Después de 24 horas de incubación a 37 °C, el líquido alantoideo se recogió en grupos. Se extrajo una muestra de uno de los grupos se tituló y se sometió a un ensayo de inocuidad. Los resultados se resumen en la Tabla 7 (estudio C). Los resultados muestran que la puntuación promedio de ciliostasis era de 18, que es similar a la observada en los ensayos anteriores para BI H120. No se observó nefritis y se encontró algo de mucus en la tráquea, solamente en uno de los 15 pollos.

Conclusión

30 Este ejemplo demuestra que pueden producirse cepas para vacunas inocuas contra virus similares a QX-BI por la realización de pases de una cepa similar a QX-BI en huevos de pollo en estado embrionario en veces múltiples. En este Ejemplo, niveles de pases desde 25 a 80 produjeron virus atenuados con perfiles de inocuidad a la par con una vacuna contra la BI aceptable conocida.

Ejemplo 4: EFICACIA DE VACUNAS DERIVADAS DE LA CEPASIMILAR A QX-BI, L-1148

35 En este ejemplo, se evaluó la eficacia de dos cepas de vacunas derivadas de la cepa similar a QX-BI, L-1148. Las cepas de vacunas ensayadas fueron L-1148(p65) y L-1148(p80) (véase el Ejemplo 3).

Se vacunaron pollos de tipo de capa SPE de un día de edad por pulverización (0,5 ml por dosis). Dos semanas después de la vacunación, cada pollo se expuso a una dosis de 10^{4.0} DIH₅₀ de la cepa D388 de la BI (una cepa similar a QX-BI virulenta aislada en los Países Bajos).

40 La actividad ciliar de los explantes traqueales se examinó 5 días después de la exposición. Inmediatamente después de la muerte se extirpó la tráquea, se aclaró y se conservó en solución salina fisiológica a 37 °C hasta posterior

procesamiento. Se cortaron manualmente pequeñas secciones transversales de la tráquea. Se examinó la actividad ciliar de 3 secciones de la parte superior, 4 secciones de la parte media y 3 secciones de la parte inferior de la tráquea al microscopio de bajo aumento.

La actividad ciliar se puntuó usando los siguientes criterios de clasificación:

Puntuación	Criterios
0	≥50 % de la sección de la tráquea muestra actividad ciliar.
1	<50 % de la sección de la tráquea muestra actividad ciliar.

5

Para una sección traqueal determinada, la actividad ciliar se consideró normal cuando al menos el 50 % (puntuación 0) del anillo interno mostró movimiento ciliar vigoroso. Se consideró que un pollo no estaba afectado si no menos de 9 de 10 anillos mostraron actividad ciliar normal. El ensayo no fue válido si las secciones traqueales se examinaron microscópicamente más de dos horas después del muestreo de las tráqueas.

10 En la Tabla 8 se resumen los resultados

Tabla 8: Resumen del estudio de eficacia

Vacuna	DIH ₅₀ por dosis	Exposición	N protegidos/N total
Ninguna	--	No	19/20
Ninguna	--	Sí	0/20
L-1148(p65)	10 ^{3,3}	Sí	20/20
	10 ^{3,0}	Sí	20/21
	10 ^{2,7}	Sí	20/20
	10 ^{2,4}	Sí	0/20
L-1148(p80)	10 ^{3,3}	Sí	17/20

15

En el grupo de control no vacunado y no expuesto, uno de los 20 pollos mostró una disminución de la actividad ciliar sin razones concretas. En los otros pollos, el movimiento ciliar era normal. En el grupo expuesto no vacunado, todos los pollos mostraron disminución de la actividad ciliar. En los grupos vacunados con L-1148(p65) y L1148(p80), la protección fue mejor que la prescrita por autoridades reguladoras (por ejemplo, al menos un 80 % de protección) excepto en el grupo vacunado con 10^{2,4} DIH₅₀ de L-1148(p65) en el que no se observó protección.

Este Ejemplo demuestra la eficacia de las cepas de vacunas derivadas de cepas similares a QX-BI por la realización de pases en serie.

20 **Ejemplo 5: EVALUACIÓN DE INOCUIDAD DE CEPAS DE VACUNAS SIMILARES A QX-BI ADICIONALES**

INTRODUCCIÓN

25

En este ejemplo se evaluó la inocuidad de la cepa similar a QX-BI L-1148(p80) (denominada también en el presente documento "Virus de Semilla Maestra" o "VSM-p80") en pollos junto con la cepa L-1148 a nivel del pase 101 ("L-1148(p101)") y la cepa 1449-2 a nivel del pase 18 ("1149-2(p18)"). Se dividieron 250 pollos, Leghorn White hembra sanos, en cinco grupos de 50 pollos cada uno, este Ejemplo se usó de acuerdo con el estudio diseñado mostrado en la Tabla 9.

Tabla 9: Diseño del Estudio

Grupo N°	N° de aves	Vacuna	Edad de vacunación
1	50	MSV-p80	Día de la eclosión
2	50	MSV-p80	7 días de edad
3	50	L-1148(p101)	Día de la eclosión
4	50	1449-2(p18)	Día de la eclosión
5	50	Diluyente solo control	Día de la eclosión

30

La vacunación se realizó por la vía oculonasal, recibiendo cada pollo la vacuna correspondiente en un volumen de 0,2 ml (0,1 ml en cada ojo). Todas las vacunas se administraron a una dosis de 10^{5,0} DIH₅₀/ave.

Durante el estudio, las aves se observaron diariamente para determinar los síntomas clínicos. Se registró cualquier indicio clínico o mortalidad. Las aves que murieron durante el indicio clínico se sometieron a examen post mortem.

Los oviductos se examinaron a las 11 semanas de edad, excepto los de las gallinas de grupo 2 que se examinaron a las 12 semanas de edad. Se realizó la eutanasia de las gallinas y se abrió la cavidad celómica y el oviducto completo se examinó macroscópicamente externa e internamente (diseccionándolo longitudinalmente con unas tijeras) para determinar la presencia de quistes, estenosis, deformación o aplasia.

RESULTADOS

Los resultados de mortalidad se resumen en la Tabla 10.

Tabla 10: Resultados de Mortalidad

Grupo N°.	Vacuna	Mortalidad	Porcentaje
1	MSV-p80	2 de 50	4 %
2	MSV-p80	1 de 50	2 %
3	L-1148(p101)	6 de 50	12 %
4	1449-2(p18)	11 de 50	22 %
5	Diluyente solamente control	0 de 50	0 %

Los resultados del examen del oviducto se resumen en la Tabla 11.

Tabla 11: Examen de Oviductos Post Mortem

Grupo	Vacuna	Edad de vacunación	Oviductos quísticos-apláxicos	Porcentaje
1	MSV-p80	Día de incubación	6 de 48	12,5 %
2	MSV-p80	7 días de edad	0 de 49	0 %
3	L-1148(p101)	Día de eclosión	4 de 43	9,3 %
4	1449-2(p18)	Día de eclosión	2 de 39	5,1 %
5	Diluyente solo control	Día de eclosión	0 de 50	0 %

En el grupo 1, 6 de 48 pollos (12,5 %) presentaron oviductos quísticos y aplasia en el segmento superior. Un pollo presentó un pequeño quiste de 4,4 mm de diámetro. Este se localizó cerca de la pared y no afectó a la estructura tubular del oviducto.

En el grupo 2, los 49 pollos supervivientes presentaron un ovario y oviducto normales. Un pollo presentó un pequeño quiste de 2,4 x 4,1 mm. Este se encontraba cerca del ovario pero no afectó a la estructura tubular del oviducto.

En el grupo 3, 4 de 43 pollos (9,3 %) presentaron oviductos quísticos y aplasia del segmento superior.

En el grupo 4, 2 de 39 pollos (5,13 %) presentaron oviductos quísticos y aplasia del segmento superior.

DISCUSIÓN

La mortalidad relativamente baja y la escasa aparición de oviductos quísticos-apláxicos observados en las aves vacunadas con las vacunas del ensayo indica que estas vacunas son generalmente inocuas. La vacuna de VSM-p80 administrada a gallinas de 7 días de edad pareció tener un perfil de inocuidad particularmente bueno y cumple con los requisitos de seguridad de la Farmacopea Europea.

Ejemplo 6: REVERSIÓN PARA ESTUDIO DE VIRULENCIA

INTRODUCCIÓN

Como se indica en el Ejemplo 5, la cepa similar a QX-BI, L-1148(p80) se denominó Virus de Semilla Maestra o "VSM-p80". En este ejemplo, se evaluó la predisposición del MSV-80 y su derivado "VSM+1BP" sometido a retro-pases para revertir la virulencia.

En este ejemplo se usaron las siguientes vacunas

(A) IB-QX VSM-p80 (es decir L-1148(p80)) en una dosis de $10^{6.0}$ DIH₅₀ por pollo.

(B) IB-QX VSMp80 sometida a retro-pases recuperada después de realizar 1 retro-pase en pollos (“VSM+1BP”) en una dosis de $10^{6.0}$ DIH₅₀ por pollo. El procedimiento de realización de retro-pases es el siguiente: (i) 5 pollos SPE de 14 días se vacunaron mediante colirio con 0,1 ml que contenía $10^{4.0}$ DIH₅₀ por dosis de VSM-p80; (ii) Cuatro días después de la vacunación se realizó la eutanasia de los pollos y se preparó una suspensión de la mucosa traqueal; (iii) La suspensión traqueal se inoculó a un segundo grupo de 5 pollos SPE de 14 días. Las muestras de la mucosa traqueal se ensayaron para determinar la presencia del virus por RT-PCR e inoculación en huevos. En la primera realización de retro-pases en los pollos, el virus se detectó por PCR y por inoculación en huevos; sin embargo, no pudo detectarse ningún virus en la segunda realización de retro-pase en los pollos. El virus obtenido de las muestras de la mucosa traqueal en el primer pase en los pollos se amplificó y se denominó VSM+1BP.

Un total de 51 pollos SPE de un día se dividieron en tres grupos y se vacunaron de acuerdo con el diseño del estudio mostrado en la Tabla 12.

Tabla 12: Diseño del Estudio

Grupo	Nº de pollos	Vacuna	Dosis	Volumen
1	17	VSM-p80	$10^{6.0}$ DIH ₅₀	0,1 ml
2	17	VSM+1BP	$10^{6.0}$ DIH ₅₀	0,1 ml
3	6	Controles no vacunados	--	--

La vacunación se realizó por vía oculonasal, recibiendo cada pollo la correspondiente vacuna en volumen de 0,1 ml (0,05 ml en cada ojo).

Se examinó la actividad ciliar de explantes traqueales los días 5, 7 y 10 después de la vacunación. Se realizó la eutanasia de los pollos por inhalación de CO₂ al 100 %. Inmediatamente después de la muerte, se extirpó la tráquea y se aclaró con y se almacenó en solución salina fisiológica a 37 °C hasta posterior procesamiento. Se realizaron secciones transversales de 0,6 mm de las tráqueas usando un cortador de tejidos Mcllwain (Mickle Laboratory Engineering Co., Ltd., Surrey, UK). Las secciones transversales de la tráquea se combinaron con 2,0 ml de solución salina fisiológica a 37 °C en una placa de Petri. Se examinó la actividad ciliar de 3 secciones de la parte superior, 4 secciones de la parte media y 3 secciones de la parte inferior de las tráqueas con un microscopio de bajo aumento. Se examinaron todos los explantes traqueales en las 2 horas después del muestreo. La actividad ciliar se puntuó en una escala de 0 a 4 usando las siguientes definiciones:

PUNTUACIÓN

DEFINICIÓN

- 0 En todo el corte traqueal los cilios mostraron actividad.
- 1 Los cilios de más del 67 % pero menos del 100 % del corte traqueal mostraron actividad.
- 2 Los cilios del 33 % al 67 % de la tráquea mostraron actividad.
- 3 Los cilios de menos de 33 % pero más del 0 % del corte traqueal mostraron actividad.
- 4 En todo el corte traqueal los cilios no mostraron actividad

Se evaluaron pollos de cada grupo para (a) la actividad ciliar de explantes traqueales, (b) examen patológico general, (c) histología de los riñones y (d) serología. La ciliostasis se calculó dividiendo la suma de las puntuaciones de las secciones traqueales que mostraron cese por el número de pollos por grupo. Para el examen patológico general, se realizó la necropsia de cada pollo para determinar cualquier anomalía que podría relacionarse con la vacuna. Se realizó el examen histológico de tejidos renales fijados con formalina y los hallazgos se registraron como: sin nefritis, nefritis leve, moderada o grave. Para el análisis serológico, se realizó una neutralización de suero y ensayos de ELISA en suero recogido de diez pollos de un día de edad.

RESULTADOS

1. Indicios clínicos

Durante el estudio, no se observaron indicios clínicos atribuibles al VSM-p80 o al VSM+1BP. Sin embargo, se encontró un pollo muerto vacunado con VSM-p80 2 después de la vacunación. En la necropsia se observó traqueítis y neumonía. Se determinó que la causa de la muerte fue por asfixia debido a una gran cantidad de mucus en la tráquea. Se consideró que la bronquitis infecciosa era una causa improbable de muerte porque ninguno de los otros

pollos mostró ningún indicio clínico y la muerte se produjo solamente 2 días después de la vacunación, un período de tiempo que es mucho menor que el período de incubación para BI (4 días).

2. Actividad Ciliar

5 En la Tabla 13 se presentan las puntuaciones de ciliostasis los días 5, 7 y 10 después de la vacunación. Con la excepción de una muestra traqueal de una sección, no hubo cese de actividad ciliar en ninguna de las muestras traqueales recogidas el día 5 después de la vacunación. Sin embargo, los días 7 y 15, se observó un grado relativamente pequeño del cese de actividad ciliar en ambos grupos. Las puntuaciones de ciliostasis promedio eran de 15 y 10 para el VSM-p80 y el VSM+1BP, respectivamente.

3. Examen patológico e histología de la tráquea y riñones

10 Excepto algo de palidez no específica en los riñones, no se observaron anomalías microscópicas ni en las tráqueas ni en los riñones. (Véase la Tabla 13). Se observó alguna infiltración linfocelular intersticial durante el examen histopatológico de las muestras renales. La ausencia de otras lesiones (degeneración granular, vacuolación y descamación del epitelio tubular y ausencia de infiltración masiva de heterófilos) sugirió que la infiltración linfocítica observada se debe más probablemente al inicio de una respuesta inmune.

15 Tabla 13. Puntuaciones de Ciliostasis

Vacuna	Puntuación de Ciliostasis días después de la vacunación				Tráquea (anomalía macroscópica)	Riñones	
	5	7	10	Promedio		Anomalía macroscópica	Nefritis
VSM+1BP	0,0	14,8	16,4	10	Normal	Normal	Ninguno
VSM-p80	0,2	37,4	8,4	15	Normal	Normal	Ninguno
Ninguna	0,0	0,0	0,2	0	Normal	Normal	Ninguno

4. Serología

En los pre-sueros no se detectaron anticuerpos contra el Virus de la Bronquitis Infecciosa (datos no mostrados).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

20 Las puntuaciones de ciliostasis promedio para los pollos vacunados con VSM-p80 y VSM+1BP eran inferiores a 25 y ningún pollo mostró indicios clínicos destacables de bronquitis infecciosa aviar. Se puede llegar a la conclusión de que el VSM-p80 (es decir L-1148(p80)) es inocuo en el tracto respiratorio y los riñones y cumple con los requisitos convencionales. Adicionalmente, no se indica un aumento de virulencia del VSM-p80 después de la realización de retro-pases en los pollos.

25 **Ejemplo 7: EFICACIA Y DOSIS PROTECTORA MINIMA DE VACUNAS SIMILARES A QX-BI**

INTRODUCCIÓN

En este ejemplo, se determinó la dosis protectora mínima de cuatro vacunas similares de QX-BI en pollos expuestos a un virus similar a QX-BI virulento.

En este ejemplo se usaron las siguientes vacunas vivas:

- 30 (1) el VSM-p80 sometido a pases dos veces adicionales, denominado en el presente documento "VSM-p80 X+2" (que por lo tanto se ha sometido a pases un total de 82 veces);
- (2) el VSM-p80 sometido a pases cinco veces adicionales, denominado en el presente documento "VSM-p80 X+5" (que se ha sometido a pases un total de 85 veces);
- (3) la cepa L-1148 sometida a pases 101 veces, denominada en el presente documento L-1148(p101); y
- 35 (4) la cepa 1449-2 sometida a pases 19 veces, denominada en el presente documento 1449-2(p19).

En este estudio se usó un total de 208 pollos SPE sanos de un día. Los pollos se vacunaron con diferentes dosis de las vacunas anteriormente mencionadas por pulverización grosera (usando un pulverizador de flores disponible en el mercado). 21 días después de la vacunación se expuso a los pollos a $10^{4.0}$ DIH₅₀ de la cepa similar a QX-BI virulenta, D388 mediante un colirio (0,05 ml en cada ojo). Cinco días después de la exposición se determinó la actividad ciliar en explantes traqueales en 20 pollos. Se extrajo sangre el día de la vacunación y 21 días después de la vacunación. En la Tabla 14 se resume el diseño experimental.

Tabla 14. Diseño Experimental

Grupo	Vacuna	Cantidad por dosis	N°.	Sucesos (día de vida)		
				1	21	26
1	VSM-p80 X+2	10 ^{3.0} DIH ₅₀	22	Vacunación y Serología	Exposición (n = 20) y Serología	ECT y Muestreo de riñones y tráqueas
2	VSM -p80 X+5	10 ^{2.7} DIH ₅₀	22			
3	VSM -p80 X+5	10 ^{3.0} DIH ₅₀	22			
4	VSM -p80 X+5	10 ^{3.3} DIH ₅₀	22			
5	VSM -p80 X+2	10 ^{3.3} DIH ₅₀	22			
6	1449-2(p19)	10 ^{3.3} DIH ₅₀	22			
7	L-1148(p101)	10 ^{3.3} DIH ₅₀	22			
8	no vacunado/ expuesto	N/A	22	Serología		
9	no vacunado/ expuesto	N/A	22	Serología	Serología	

5 Cinco días después de la exposición, se examinó la actividad ciliar de los explantes traqueales en 20 pollos. A los pollos se les realizó la eutanasia e inmediatamente después de la muerte se extirpó la tráquea, se aclaró con y se conservó en solución salina fisiológica a 37 °C hasta posterior procesamiento. Se cortaron a mano pequeñas secciones transversales de la tráquea. Se examinó la actividad ciliar de tres secciones de la parte superior, cuatro secciones de la parte media y tres secciones de la parte inferior de la tráquea con un microscopio de bajo aumento. La actividad ciliar se puntó usando los siguientes criterios de clasificación:

PUNTUACIÓN	CRITERIOS
0	Al menos el 50 % de las secciones traqueales mostraron actividad ciliar.
1	Menos del 50 % de las secciones traqueales mostró actividad ciliar.

10 Para una sección traqueal determinada, se consideró una actividad ciliar normal cuando al menos el 50 % (puntuación 0) del anillo interno mostró un movimiento ciliar vigoroso. Se consideró que un pollo no está afectado si no menos de 9 de los 10 anillos mostraban actividad ciliar normal. El ensayo no se consideró válido si las secciones traqueales se examinaron microscópicamente más de 2 horas después del muestreo de las tráqueas.

Se realizó la necropsia en cada pollo 5 días después de la exposición para determinar cualquier anomalía en los riñones que pudiera ser un resultado de la infección por el VBI. Para puntuar los hallazgos macroscópicos en los riñones, se usaron los siguientes criterios: normal = n. a.; inflamación, riñones amarillos o cristales de urato = 1.

15 RESULTADOS

1. Indicios clínicos después de la vacunación

En la Tabla 15 se resumen los resultados del examen ciliar y patológico general.

Tabla 15. Resultados del ensayo de movimiento ciliar y otras observaciones

grupo	Vacuna	Cantidad por dosis	Protegidos/Total (%)	Otras observaciones	
				Riñones	Tráquea
1	VSM-p80 X+2	10 ^{3.0} DIH ₅₀	18/19 (95)	Ninguna	Ninguna
2	VSM -p80 X+5	10 ^{2.7} DIH ₅₀	0/20 (0)	Ninguna	Ninguna
3	VSM -p80 X+5	10 ^{3.0} DIH ₅₀	17/20 (85)	Ninguna	Ninguna
4	VSM -p80 X+5	10 ^{3.3} DIH ₅₀	17/20 (85)	Ninguna	Ninguna
5	VSM -p80 X+2	10 ^{3.3} DIH ₅₀	18/20 (90)	Ninguna	Ninguna
6	1449-2(p19)	10 ^{3.3} DIH ₅₀	20/20 (100)	1/20*	Ninguna
7	L-1148(p101)	10 ^{3.3} DIH ₅₀	13/20 (65)	Ninguna	Ninguna
8	no vacunado/ expuesto	N/A	0/20 (0)	Ninguna	Ninguna
9	no vacunado/ expuesto	N/A	20/20 (100)	Ninguna	Ninguna

*Uno de los pollos tuvo lesiones renales.

Los resultados mostrados en la Tabla 15 muestran que la vacuna VSM-p80 es eficaz siempre que se use una dosis de $10^{3.0}$ DIH₅₀ o más. Una dosis de $10^{2.7}$ DIH₅₀ no induce protección. Existió una pequeña diferencia, no significativa, en cuanto a la protección generada por VSM-p80 X+2 y VSM-p80 X+5; en este estudio X+2 proporcionó una protección algo mejor que X+5. La cepa L-1148(p101) proporcionó menos protección que los niveles con menores pases.

RESUMEN

Este Ejemplo demuestra adicionalmente la inocuidad y eficacia de vacunas derivadas del QX-BI, VSM-p80.

Ejemplo 8: PROPAGACIÓN DEL QX-BI ATENUADO ENTRE POLLOS Y DISEMINACIÓN EN EL CUERPO

INTRODUCCIÓN

Este ejemplo investigó la diseminación de la cepa de la vacuna QX-BI, VSM-p80 QX-BI el cuerpo y la propagación de VSM-p80 QX-BI en pollos no vacunados.

Diseño Experimental

1. Animales

Se dividió un total de 165 pollos SPE en los grupos mostrados en la Tabla 16. Los pollos se alojaron de acuerdo con procedimientos normales. El alimento y el agua estaban disponibles a discreción. Durante el estudio, todos los pollos se observaron para determinar indicios clínicos.

Tabla 16. Animales

Grupo	Edad (n)	Descripción
1	1 día (55)	Vacunado con $10^{5.0}$ DIH ₅₀ VSM-p80 QX-BI por pollo. Se añadieron 30 pollos al grupo 2 tres días después de la vacunación.
2	7 días (35)	Pollos no vacunados.
3	14 días (35)	Pollos no vacunados (se añadieron al grupo 2, 14 días después de la vacunación del grupo 1).
4	1 día (30)	Pollos no vacunados (se añadieron al grupo 2, 7 días después de la vacunación del grupo 1).
5	1 día (10)	Usados para la extracción de sangre

2. Procedimientos

2.1 Vacunación

Se diluyó un vial de VSM-p80 QX-BI que contenía $10^{8.2}$ DIH₅₀, en 157,5 ml de tampón y usó en las 2 horas de preparación. Los pollos del grupo 1 de 1 día se vacunaron, mediante colirio, con 0,1 ml de virus diluido ($10^{5.0}$ DIH₅₀ de VMS-p80 QX-BI por pollo). Después de la vacunación, las muestras de vacunas usadas se conservaron a -50 °C. Se realizó la titulación inversa para determinar la titulación de virus en la vacuna administrada. Se observó que la vacuna administrada contenía $10^{6.07}$ DIH₅₀ de QX-BI por ml, correspondiente a una dosis de $10^{5.07}$ DIH₅₀ por pollo.

2.2 Diseño Experimental

Los pollos del grupo 1 se vacunaron con VSM-p80 QX-BI. Tres días después de la vacunación, 30 pollos vacunados del grupo 1 se añadieron a una unidad de contención que contenía 35 pollos no vacunados del grupo 2 de la misma edad y origen. Siete días después de la vacunación, se añadió un grupo de 30 pollos no vacunados del grupo 4 a la unidad de contención. Catorce días después de la vacunación, 35 pollos no vacunados del grupo 3 de la misma edad y origen que los pollos vacunados se añadieron a la unidad de contención. A intervalos regulares, 2 pollos de cada uno de los grupos 2 - 4 se sacrificaron por inhalación de CO₂ al 100 % y para determinar la presencia del VBI, se tomaron muestras de la bursa, duodeno, pulmón, riñón, páncreas y tráquea.

El VBI se detectó en muestras de órganos por tinción inmunohistoquímica para el epítipo del VBI 48,4 (una nucleoproteína) de muestras fijadas con formalina. Después del sacrificio de los pollos, se tomó una muestra de frotis de la cloaca y de la orofaringe.

La presencia de QX BI en los frotis se detectó por PCR usando un kit para qRT-PCR de una etapa SuperScript™ III de Invitrogen. Las mezclas de la PCR contenían 25 µl de mezcla 2x, 18 µl de agua, 1 µl de Taq platino, 2 µl de cebador directo, 2 µl cebador inverso y 2 µl de molde (ARN). Se usaron los siguientes cebadores:

40 Cebadores comunes para el VBI

ES 2 702 089 T3

SX3 + A/B directo 5'-TAATACTGGYAATTTTTCAGATGG-3' (SEQ ID NO: 5)

SX4 – inverso 5'-AATACAGATTGCTTACACCACC-3' (SEQ ID NO: 6)

Cebadores específicos para QX-BI

Alg-QX-139 directo 5'-GCTTATGCAGTAGTCAAT-3' (SEQ ID NO: 7)

5 Alg-QX-394-inverso 5'-CACGTGGAATCATGCCTGTTAT-3' (SEQ ID NO: 8)

Como molde se usó ARN de la tráquea. El virus se usó como control positivo.

Se realizó RT-PCR de acuerdo con el siguiente programa:

- 10
1. 30 min 50°C
 2. 10 min 95°C
 3. 30 sec 95°C
 4. 30 sec 50°C
 5. 45 sec 72°C, etapas 3-5 para 40 ciclos
 6. 7 min 72°C
 7. 5 min 4°C

15 Los productos de la RT-PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa.

Se tomaron muestras de sangre de 10 pollos de 1 día, y el día 21 del estudio de 10 pollos de cada uno de los grupos 1, 2, 3 y 4. La sangre se extrajo decapitando a los pollos de 1 día o por punción de la vena del ala. Las titulaciones de los anticuerpos se determinaron con el kit de ensayo de anticuerpos contra el VBI Flockchek™ disponible en IDEXX, Estados Unidos o el kit de IH-BI Flocksreen™ de X-Ovo, Francia.

20 3. Resultados

En La Tabla 17 se resumen los resultados.

			Días después de la vacunación									
Grupo	Procedimiento	Órgano	2	4	7	9	11	14	16	18	21	23
1	Immuno-histología	Bursa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Duodeno	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Pulmón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Riñón	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Páncreas	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
		Tráquea	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	PCR	Frotis de cloaca	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
		Frotis de laringe	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-

			Días después del primer contacto con pollos vacunados									
Grupo	Procedimiento	Órgano	1	4	6	8	11	13	15	18	20	
2	Immuno-histología	Bursa	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Duodeno	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Pulmón	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Riñón	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Páncreas	-	-	-	-	+	-	-	-		
		Tráquea	-	-	-	+	-	-	-	-		
	PCR	Frotis de cloaca	-	-	-	-	+	-	+	-	-	
		Frotis de laringe	-	+	+	-	-	-	+	-	-	
			Días después del primer contacto con pollos vacunados									
Grupo	Procedimiento	Órgano	2	4	7	9	11	14				
3	Immuno-histología	Bursa	-									
		Duodeno	-									
		Pulmón	-									
		Riñón	-									
		Páncreas	-									
		Tráquea	-									
	PCR	Frotis de cloaca	-	-	-	-	-	-	-			
		Frotis de laringe	-	+	+	-	+	+				
4	Immuno-histología	Bursa	-	-	-	-						
		Duodeno	-	-	-	-						
		Pulmón	-	-	-	-						
		Riñón	-	-	-	-						
		Páncreas	-	-	-	-						
		Tráquea	-	-	-	-						
	PCR	Frotis de cloaca	+	-	-	-	-	-				
		Frotis de laringe	-	-	-	+	-	+				

5 Durante el estudio no se observaron indicios respiratorios u otros indicios clínicos que indicasen BI. En el grupo 2 murió un pollo debido a inflamación en el saco vitelino. En el grupo 1 murió un pollo debido a canibalismo. Para los ensayos serológicos, se realizaron ensayos de inhibición de la hemoaglutinación (IH) con el antígeno 793B BI ya que el antígeno QX BI no dio buena hemoaglutinación. No se detectaron anticuerpos contra la BI en ninguno de los sueros mediante el ensayo de IH o ELISA.

La tinción en el EIH detectó QX BI en las tráqueas de los pollos de 4-11 días y en el páncreas el día 4 y 11 después de la primera exposición al virus. La tinción en el EIH no detectó QX BI en la bursa, duodeno, pulmones o riñones.

10 La presencia de QX BI se detectó por tinción en el EIH y PCR de frotis de laringe y cloaca de todos los grupos. La BI se detectó por PCR en frotis de cloaca y laringe de 2-15 días después de la primera exposición a QX BI. Los frotis de laringe fueron positivos QX BI más frecuentemente que los frotis de cloaca.

4. Discusión

4.1 Diseminación

15 La detección de QX BI en la tráquea era de esperar, ya que el tracto respiratorio superior es el sitio principal de la replicación de VBI. Posteriormente se produce viremia y el virus se disemina a otros tejidos. Esto se demostró por la detección QX-BI en el páncreas. Aunque el VBI es principalmente un virus epiteliotrópico, el QX-BI en el nivel de pase 80 no pudo detectarse en los riñones o en los pulmones, sugiriendo que el virus se eliminó de estos órganos a la dosis de vacuna administrada de $10^{5.0}$ DIH₅₀ por pollo. En estudios de inocuidad de QX BI con el mismo nivel de pase en el que los pollos se vacunaron con QX BI $10^{6.0}$ DIH₅₀ por pollo, el virus se detectó en los riñones y pulmones durante 10 días después de la vacunación. En el presente estudio, QX BI se detectó en la tráquea durante 11 días y en la laringe durante 15 días. Informes bibliográficos encontraron que la BI pudo detectarse en la tráquea durante 5-10 días después de la infección durante la fase clínica y durante hasta 28 días después de la infección en la tráquea. Aunque QX BI se detectó en el páncreas no se observó ninguna anomalía durante el examen patológico general.

4.2 Propagación

25 La propagación QX BI se demostró claramente ya que la presencia de QX BI se detectó en todos los grupos no vacunados.

4.3 Inocuidad

En el nivel de pase 80, el QX BI administrado, por colirio, a una dosis $10^{5.07}$ DIH₅₀ por pollo, no causó ningún indicio clínico relacionado con la vacuna después de la vacunación. No se observaron indicios clínicos de BI en pollos no vacunados que estaban infectados por QX BI después de la exposición a pollos vacunados.

30 5. Conclusión

Después de la vacunación, se produjo una multiplicación del virus VSM-p80 de QX BI en la tráquea y el QX BI se diseminó a otros órganos. La propagación del VSM-p80 de QX BI se propagó entre pollos al menos una vez. El VSM-p80 de QX BI y la vacuna, que se sometió a pases entre los grupos, eran inocuos.

Ejemplo 9: Vacunación combinada con vacunas MM BI y QX BI

35 La eficacia de la vacunación combinada con MM BI y vacunas QX BI se ensayó en pollos SPE. Los pollos se vacunaron con la vacuna Poulvac MMBI (Fort Dodge Animal Health) el día 0 y el día 14 con vacuna viva QX BI. Las cepas vacunadas se expusieron a la cepa IT02 de la BI el día 14 y a la cepa 793B de la BI el día 35. Los resultados de la vacunación se determinaron por análisis de ensayos de ciliostasis (ECT) de secciones traqueales y determinación de patologías en el riñón. Los pollos vacunados se protegieron completamente de la exposición con las cepas IT02 y 793.

En la tabla 18 se proporciona un resumen del protocolo de vacunación respectivo y sus resultados.

Tabla 18.

	Vacunación		Exposición	ETC	Lesiones Renales
	Día 1	Día 14			
1	MM BI	QX BI	793B BI	0	0,8
2	MM BI	QX BI	IT 02 BI	0	0,0
3	Cebador BI	QX BI	793B BI	0	0,0
4	Ninguna	Ninguna	IT 02 BI	19,8	0,0
5	Ninguna	Ninguna	793B BI	29,4	0,8

6	Ninguna	Ninguna	Ninguna	0	0,0
---	---------	---------	---------	---	-----

(continuación)

		Vacunación				
	Día 1	Día 14	Exposición	ETC	Lesiones Renales	
7	Cebador BI + QX BI	Ninguna	793B BI	2,5	0,8	
8	Ninguna	Ninguna	793B BI	0	1,2	
9	Ninguna	Ninguna	Ninguna	0	0,0	

LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Wyeth
Geerligs, Harmen Jacob
Meinders, Cindy Aleida Maria
Boelm, Geert Jan
Stuurman, Bastiana Geertruida Elisabeth
- 10 <120> VACUNAS CONTRA LA BRONQUITIS INFECCIOSA DERIVADAS DE CEPAS SIMILARES A QX-BI
- <130> AM103152
- <150> 61/087228
- 15 <151> 08-08-2008
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.4
- 20 <210> 1
<211> 1657
<212> ADN
<213> Virus de la bronquitis infecciosa QX
- 25 <400> 1

ES 2 702 089 T3

```

atgttgggga agtcaactgtt tttagtgacc attttgtgtg cactatgtag tgcaaatttg      60
ttcgattctg ctaataatta tgtgtactac taccaaagtg cctttaggcc tccaaatgga      120
tggcatttgc aaggggtg gc ttatgcagta gtgaattcca ctaattatag taataatgca      180
ggttctgcac ctcaagtgcac tgttgggttt attaaggacg tctataatca aagtgcggct      240
tctatageta tgacagcacc tcttcagggt atggcttggc ctaagtcaca atttttagt      300
gcacactgta acttttctga aattacagtt tttgtcacac attggtatag tagtggtagc      360
gggtcttctc ctataacagg catgattcca cgtgatcata ttcgtatttc tgcaatgaaa      420
aatggttcct tttttataa tttaacagtt agcgtatcta aataccctaa ttttaaatct      480
tttcaatgtg ttaacaactt cacatctggt tatttaaatg gtgatcttgt ttttacttcc      540
aacaaaacta ctgatgttac gtcagcaggt gtgtatttta aagcaggtgg acctgtaaat      600
tataatatta tgaagaatt taaggttcct gcttactttg ttaatgttac agcacaagat      660
gtaattttgt gcgataattc cccaagggt ttgctagcct gccaatataa cactggcaat      720
ttttcagatg gcttttatcc ttttactaat agtacttttag ttagggaaaa gttcattgtc      780
tatogcgaaa gtagtgtaa tactactctg gcgttaacta atttactttt tactaatgta      840
agtaatgcac agcctaatag tgggtgtgtt aatacttttc atttatatca aacacaaaca      900
gctcagagtg gttattataa ttttaatttg tcatctctga gtcagtttgt gtataaggca      960
agtgtattta tgtatgggtc ttaccacct agttgttctt ttagaccaga aaccattaat     1020
agtgttttgt ggtttaattc cttgtcagtt tctcttactt atggaccctt acagggaggg     1080

```

```

tgtaagcaat ctgtttttag tgtaaggca acgtgttgtt atgcctactc ttataatggc     1140
ccaagggcat gtaaagggtg ttattcaggt gaattaagca tgaattttga atgtggattg     1200
ctggtttatg ttactaagag tcatggctct cgtatacaga ctagaacgga gcccttagta     1260
ttaacgcaac acaattataa taatattact ttagataagt gtgttgctta taatataat     1320
ggcagagtag gccaaagttt tattactaat gtgactgatt ctgctgctaa ttttagttat     1380
ttagcagatg gtgggttagc tattttagat acgtcgggtg ccatagatgt ttttgttgta     1440
aagggcagct atggtcttaa ttattacaag gttaatcctt gtgaagatgt taaccaacag     1500
ttttagtagt ctggtggcaa tatagttggc attcttactt ctagaaatga aacaggttct     1560
gaacaggttg agaaccagtt ttatgttaag ttaaccaata gctcacatcg tcgcaggcgt     1620
tctattggcc aaaacgtaac aacttgcctt tatgtta                                1657

```

5 <210> 2
 <211> 601
 <212> PRT
 <213> Virus similar a QX de la bronquitis infecciosa L1148

10 <400> 2

ES 2 702 089 T3

Met Leu Val Lys Ser Leu Phe Leu Val Thr Ile Leu Cys Ala Leu Cys
1 5 10 15

Ser Ala Asn Leu Phe Asp Ser Asp Asn Asn Tyr Val Tyr Tyr Tyr Gln
20 25 30

Ser Ala Phe Arg Pro Pro Asn Gly Trp His Leu Gln Gly Gly Ala Tyr
35 40 45

Ala Val Val Asn Ser Thr Asn Tyr Thr Asn Asn Ala Gly Ser Ala His
50 55 60

Glu Cys Thr Val Gly Val Ile Lys Asp Val Tyr Asn Gln Ser Val Ala
65 70 75 80

Ser Ile Ala Met Thr Ala Pro Leu Gln Gly Met Ala Trp Ser Lys Ser
85 90 95

Gln Phe Cys Ser Ala His Cys Asn Phe Ser Glu Ile Thr Val Phe Val
100 105 110

Thr His Cys Tyr Ser Ser Gly Ser Gly Ser Cys Pro Ile Thr Gly Met
115 120 125

Ile Pro Arg Asp His Ile Arg Ile Ser Ala Met Lys Asn Gly Ser Leu

ES 2 702 089 T3

Lys Gly Val Tyr Ser Gly Glu Leu Ser Thr Asn Phe Glu Cys Gly Leu
 385 390 395 400

Leu Val Tyr Val Thr Lys Ser Asp Gly Ser Arg Ile Gln Thr Arg Thr
 405 410 415

Glu Pro Leu Val Leu Thr Gln Tyr Asn Tyr Asn Asn Ile Thr Leu Asp
 420 425 430

Lys Cys Val Ala Tyr Asn Ile Tyr Gly Arg Val Gly Gln Gly Phe Ile
 435 440 445

Thr Asn Val Thr Asp Ser Ala Ala Asn Phe Ser Tyr Leu Ala Asp Gly
 450 455 460

Gly Leu Ala Ile Leu Asp Thr Ser Gly Ala Ile Asp Val Phe Val Val
 465 470 475 480

Gln Gly Ile Tyr Gly Leu Asn Tyr Tyr Lys Val Asn Pro Cys Glu Asp
 485 490 495

Val Asn Gln Gln Phe Val Val Ser Gly Gly Asn Ile Val Gly Ile Leu
 500 505 510

Thr Ser Arg Asn Glu Thr Gly Ser Glu Gln Val Glu Asn Gln Phe Tyr
 515 520 525

Val Lys Leu Thr Asn Ser Ser His Arg Arg Arg Arg Ser Ile Gly Gln
 530 535 540

Asn Val Thr Ser Cys Pro Tyr Val Ser Tyr Gly Arg Phe Cys Ile Glu
 545 550 555 560

Pro Asp Gly Ser Leu Lys Met Ile Val Pro Glu Glu Leu Lys Gln Phe
 565 570 575

Val Ala Pro Leu Leu Asn Ile Thr Glu Ser Val Leu Ile Pro Asn Ser
 580 585 590

Phe Asn Leu Thr Val Pro Pro Arg Asn
 595 600

<210> 3
 <211> 567
 <212> PRT
 <213> Virus similar a QX de la bronquitis infecciosa L1449-2

<400> 3

5

10

ES 2 702 089 T3

Met Leu Val Lys Ser Leu Phe Leu Val Thr Ile Leu Cys Ala Leu Cys
1 5 10 15

Ser Ala Asn Leu Phe Asp Ser Asp Asn Asn Tyr Val Tyr Tyr Tyr Gln
20 25 30

Ser Ala Phe Arg Pro Pro Asn Gly Trp His Leu Gln Gly Gly Ala Tyr
35 40 45

Ala Val Val Asn Ser Thr Asn Tyr Thr Asn Asn Ala Gly Ser Ala His
50 55 60

Gly Cys Thr Val Gly Val Ile Lys Asp Val Tyr Asn Gln Ser Val Ala
65 70 75 80

Ser Ile Ala Met Thr Ala Pro Leu Gln Gly Met Ala Trp Ser Lys Ser
85 90 95

Gln Phe Cys Ser Ala His Cys Asn Phe Ser Glu Ile Thr Val Phe Val
100 105 110

Thr His Cys Tyr Ser Ser Gly Ser Gly Ser Cys Pro Ile Thr Gly Met
115 120 125

Ile Pro Arg Asp His Ile Arg Ile Ser Ala Met Lys Asn Gly Ser Leu
130 135 140

Phe Tyr Asn Leu Thr Val Ser Val Ser Lys Tyr Pro Asn Phe Lys Ser
145 150 155 160

Phe Gln Cys Val Asn Asn Phe Thr Ser Val Tyr Leu Asn Gly Asp Leu
165 170 175

Val Phe Thr Ser Asn Lys Thr Thr Asp Val Thr Ser Ala Gly Val Tyr
180 185 190

Phe Lys Ala Gly Gly Pro Val Asn Tyr Ser Ile Met Lys Glu Phe Lys
195 200 205

Val Leu Ala Tyr Phe Val Asn Gly Thr Ala Gln Asp Val Ile Leu Cys
210 215 220

Asp Asn Ser Pro Lys Gly Leu Leu Ala Cys Gln Tyr Asn Thr Gly Asn

ES 2 702 089 T3

225	230	235	240
Phe Ser Asp Gly Phe Tyr Pro Phe Thr Asn Ser Thr Leu Val Arg Glu	245	250	255
Lys Phe Ile Val Tyr Arg Glu Ser Ser Val Asn Thr Thr Leu Ala Leu	260	265	270
Thr Asn Phe Thr Phe Thr Asn Val Ser Asn Ala Gln Pro Asn Ser Gly	275	280	285
Gly Val Asn Thr Phe His Leu Tyr Gln Thr Gln Thr Ala Gln Ser Gly	290	295	300
Tyr Tyr Asn Phe Asn Leu Ser Phe Leu Ser Gln Phe Val Tyr Lys Ala	305	310	315
Ser Asp Phe Met Tyr Gly Ser Tyr His Pro Ser Cys Ser Phe Arg Pro	325	330	335
Glu Thr Ile Asn Ser Gly Leu Trp Phe Asn Ser Leu Ser Val Ser Leu	340	345	350
Thr Tyr Gly Pro Leu Gln Gly Gly Cys Lys Gln Ser Val Phe Ser Gly	355	360	365
Lys Ala Thr Cys Cys Tyr Ala Tyr Ser Tyr Lys Gly Pro Met Ala Cys	370	375	380
Lys Gly Val Tyr Ser Gly Glu Leu Ser Thr Asn Phe Glu Cys Gly Leu	385	390	395
Leu Val Tyr Val Thr Lys Ser Asp Gly Ser Arg Ile Gln Thr Arg Thr	405	410	415
Glu Pro Leu Val Leu Thr Gln Tyr Asn Tyr Asn Asn Ile Thr Leu Asp	420	425	430
Lys Cys Val Ala Tyr Asn Ile Tyr Gly Arg Val Gly Gln Gly Phe Ile	435	440	445
Thr Asn Val Thr Asp Ser Ala Ala Asn Phe Ser Tyr Leu Ala Asp Gly	450	455	460
Gly Leu Ala Ile Leu Asp Thr Ser Gly Ala Ile Asp Val Phe Val Val	465	470	475
			480

ES 2 702 089 T3

Gln Gly Ile Tyr Gly Leu Asn Tyr Tyr Lys Val Asn Pro Cys Glu Asp
 485 490 495

Val Asn Gln Gln Phe Val Val Ser Gly Gly Asn Ile Val Gly Ile Leu
 500 505 510

Thr Ser Arg Asn Glu Thr Gly Ser Glu Gln Val Glu Asn Gln Phe Tyr
 515 520 525

Val Lys Leu Thr Asn Ser Ser His Arg Arg Arg Arg Ser Ile Gly Gln
 530 535 540

Asn Val Thr Ser Cys Pro Tyr Val Ser Tyr Gly Arg Phe Cys Ile Glu
 545 550 555 560

Pro Asp Gly Ser Leu Lys Met
 565

<210> 4
 <211> 582
 <212> PRT
 <213> Virus similar a QX de la bronquitis infecciosa 1449-10

5

<400> 4

10

Met Leu Val Lys Ser Leu Phe Leu Val Thr Ile Leu Cys Ala Leu Cys
 1 5 10 15

Ser Ala Asn Leu Phe Asp Ser Asp Asn Asn Tyr Val Tyr Tyr Tyr Gln
 20 25 30

Ser Ala Phe Arg Pro Pro Asn Gly Trp His Leu Gln Gly Gly Ala Tyr
 35 40 45

Ala Val Val Asn Ser Thr Asn Tyr Thr Asn Asn Ala Gly Ser Ala His
 50 55 60

Glu Cys Thr Val Gly Val Ile Lys Asp Val Tyr Asn Gln Ser Val Ala
 65 70 75 80

Ser Ile Ala Met Thr Ala Pro Leu Gln Gly Met Ala Trp Ser Lys Ser
 85 90 95

Gln Phe Cys Ser Ala His Cys Asn Phe Ser Glu Ile Thr Val Phe Val
 100 105 110

ES 2 702 089 T3

Thr His Cys Tyr Ser Gly Gly Ser Gly Ser Cys Pro Ile Thr Gly Met
 115 120 125

Ile Pro Arg Asp His Ile Arg Ile Ser Ala Met Lys Asn Gly Ser Leu
 130 135 140

Phe Tyr Asn Leu Thr Val Ser Val Ser Lys Tyr Pro Asn Phe Lys Ser
 145 150 155 160

Phe Gln Cys Val Asn Asn Phe Thr Ser Val Tyr Leu Asn Gly Asp Leu
 165 170 175

Val Phe Thr Ser Asn Lys Thr Thr Asp Val Thr Ser Ala Gly Val Tyr
 180 185 190

Phe Lys Ala Gly Gly Pro Val Asn Tyr Ser Ile Met Lys Glu Phe Lys
 195 200 205

Val Leu Ala Tyr Phe Val Asn Gly Thr Ala Gln Asp Val Ile Leu Cys
 210 215 220

Asp Asn Ser Pro Lys Gly Leu Leu Ala Cys Gln Tyr Asn Thr Gly Asn
 225 230 235 240

Phe Ser Asp Gly Phe Tyr Pro Phe Thr Asn Ser Thr Leu Val Arg Glu
 245 250 255

Lys Phe Ile Val Tyr Arg Glu Ser Ser Val Asn Thr Thr Leu Ala Leu
 260 265 270

Thr Asn Phe Thr Phe Thr Asn Val Ser Asn Ala Gln Pro Asn Ser Gly
 275 280 285

Gly Val Asn Thr Phe His Leu Tyr Gln Thr Gln Thr Ala Gln Ser Gly
 290 295 300

Tyr Tyr Asn Phe Asn Leu Ser Phe Leu Ser Gln Phe Val Tyr Lys Ala
 305 310 315 320

Ser Asp Phe Met Tyr Gly Ser Tyr His Pro Ser Cys Ser Phe Arg Pro
 325 330 335

Glu Thr Ile Asn Ser Gly Leu Trp Phe Asn Ser Leu Ser Val Ser Leu
 340 345 350

Thr Tyr Gly Pro Leu Gln Gly Gly Cys Lys Gln Ser Val Phe Ser Gly

ES 2 702 089 T3

<400> 5
taatactggy aattttcag atgg 24

5 <210> 6
<211> 22
<212> ADN
<213> Cebador para virus de la bronquitis infecciosa

10 <400> 6
aatacagatt gcttacacca cc 22

15 <210> 7
<211> 18
<212> ADN
<213> Cebador para virus de la bronquitis infecciosa

20 <400> 7
gcttatgcag tagtcaat 18

25 <210> 8
<211> 22
<212> ADN
<213> Cebador para virus de la bronquitis infecciosa

<400> 8
cacgtggaat catgcctgtt at 22

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna que comprende: (i) un virus de la bronquitis infecciosa (BI) vivo y atenuado aislado derivado de un virus similar a QX-BI, seleccionándose dicho virus atenuado aislado de las cepas denominadas VSM65 L1148 QX BI que se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células (CECC) con el N.º de acceso provisional 09061002, VSM80 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061004, VSM65 x+5 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061003 , o VSM80 x+5 L1148A BI QX que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061001; y (ii) un vehículo farmacéuticamente aceptable.
2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente:
 - (a) al menos un virus de la BI vivo atenuado adicional derivado de un virus que no tiene una proteína S1 codificada por una secuencia de nucleótidos que es al menos el 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 1 o
 - (b) uno o más componentes antigénicos adicionales derivados de un agente infeccioso distinto del virus de la BI.
3. Una composición de vacuna de la reivindicación 1, para su uso en la vacunación de un ave contra la bronquitis infecciosa (BI).
4. Una composición de vacuna como según la reivindicación 1, para su uso en la protección de un hospedador aviar frente a un virus similar a QX de la bronquitis infecciosa (BI).
5. La vacuna para el uso de la reivindicación 4, en el que dicho hospedador aviar es un pollo.
6. La vacuna para el uso de las reivindicaciones 4 o 5, en el que dicha vacuna se administra a través de un colirio o por pulverización.
7. La vacuna para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que dicho virus QX o similar a QX se atenúa mediante el paso a través de huevos.
8. Una o más de las cepas denominadas VSM65 L1148 QX BI (que se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células (CECC) con el N.º de acceso provisional 09061002), VSM80 L1148A QX BI (que se depositó en la CECC con el número de acceso provisional 09061004), VSM65 x+5 L1148A QX BI (que se depositó en la CECC con el número de acceso provisional 09061003), o VSM80 x+5 L1148A QX BI (que se depositó en la CECC con el número de acceso provisional 09061001), para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7.
9. Un virus de la bronquitis infecciosa (BI) atenuado aislado derivado de un virus similar a QX-BI, seleccionándose dicho virus atenuado aislado de las cepas denominadas VSM65 L1148 QX BI que se depositó en la Colección Europea de Cultivos de Células (CECC) con el N.º de acceso provisional 09061002, VSM80 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061004, VSM65 x+5 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061003, o VSM80 x+5 L1148A QX BI que se depositó en la CECC con el N.º de acceso provisional 09061001.