

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 709 190**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61P 31/14** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2011 PCT/US2011/066384**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12092053**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2011 E 11813490 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018 EP 2658570**

54 Título: **Composiciones de vacuna contra el virus de la diarrea viral bovina tipo 1B y procedimientos**

30 Prioridad:

**27.12.2010 US 201061427361 P**

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

**15.04.2019**

73 Titular/es:

**ELANCO US INC. (100.0%)  
2500 Innovation Way  
Greenfield, IN 46140, US**

72 Inventor/es:

**WEISE, DALE, WADE y  
HARRIS, JAMES, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 709 190 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

Composiciones de vacuna contra el virus de la diarrea viral bovina tipo 1B y procedimientos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general a los campos de la medicina veterinaria y vacunas para animales. Más particularmente, se refiere a composiciones inmunogénicas, procedimientos para elaboración de tales composiciones y procedimientos para prevenir, tratar, mejorar y/o manejar infecciones microbianas o virales, o un síntoma de las mismas, y particularmente infecciones respiratorias en ganado mamífero, incluyendo enfermedades multifactoriales tales como complejo de enfermedades respiratorias bovinas (BRDC). Se divulgan composiciones antigénicas y procedimientos para su uso en la formulación y administración de agentes profilácticos y terapéuticos para prevenir, tratar y/o aliviar uno o más síntomas de la infección por pestivirus, y en particular los pestivirus responsables o implicados en la fiebre del embarque, BRDC y diarrea viral bovina en animales susceptibles o infectados.

**Descripción del estado de la técnica relacionado**

BRDC es un complejo de enfermedad multifactorial que afecta con frecuencia a los terneros para carne/leche en los canales de comercialización y en los pastos o corrales de engorde de destino. Los principales agentes etiológicos bacterianos de esta enfermedad son *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni* (anteriormente *Haemophilus somnus*) y *Mycoplasma bovis*. Los agentes virales que se han asociado con la fiebre del embarque son herpesvirus bovino tipo 1 (BHV-1), parainfluenza III, (PI<sub>3</sub>) Virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) y Virus de la diarrea viral bovina (BVDV).

**Virus de la diarrea viral bovina (BVDV)**

El BVDV se reconoce ahora como un agente etiológico importante en el complejo de enfermedades respiratorias bovinas (BRDC), (a menudo conocido como "fiebre del embarque"). La enfermedad, que infecta al ganado de todas las edades (incluidos los terneros lactantes), se caracteriza por la respiración rápida, la tos, la depresión, la pérdida de apetito, la descarga ocular y nasal y las temperaturas elevadas. En un brote agudo, la muerte puede sobrevenir dentro de las 24 horas posteriores al inicio de los síntomas. El tratamiento del BVDV es problemático debido a la ausencia de terapias antivirales y la tasa de mortalidad por infección de pestivirus es alta. Además, el tratamiento de los patógenos bacterianos involucrados en BRDC también se complica en muchos casos por la resistencia antimicrobiana a los fármacos terapéuticos.

Los virus de la diarrea viral bovina son un grupo dispar de virus que se pueden clasificar fenotípicamente (véase, por ejemplo, Baker, 1995) (citopático o no citopático) y genotípicamente (véase, por ejemplo, Ridpath et al., 1994; Vilcek et al., 2001 y Flores et al., 2002). El establecimiento de una inmunidad protectora contra el BVDV en el ganado ha sido problemático por varias razones. Al igual que en otras enfermedades mediadas por virus, los niveles de anticuerpos séricos contra el BVDV no se correlacionan necesariamente con la protección contra la enfermedad. El establecimiento de inmunidad protectora en los terneros lactantes presenta obstáculos adicionales, ya que los anticuerpos maternos contra el BVDV pueden agotar el inmunógeno inyectado y neutralizar efectivamente la vacuna.

Un estudio de Fulton et al., (2006) evaluó 21.743 terneros que ingresaron en los lotes de engorde de los Estados Unidos y determinó que 88 terneros se infectaron persistentemente (PI) con el BVDV. De los 88 terneros con PI, 77,9% estaban infectados con BVDV-1b; solo el 11,6% estaba infectado con BVDV-1a, y solo el 10,5% estaba infectado con BVDV-2a. Desafortunadamente, si bien estos datos demostraron claramente que el BVDV-1b es el subtipo predominante del ganado con PI que ingresa a los lotes de engorde domésticos, actualmente no existen vacunas con licencia del USDA que sean específicas para la infección por BVDV-1b. Fulton et al., (Can J Vet Res: Vol. 66, 181-109; 2002) también divulgó que BVDV-1b es el subtipo de BVDV predominante en terneros con enfermedad respiratoria.

Por lo tanto, por estas y otras razones inherentes a la técnica anterior, existe la necesidad de formulaciones de vacuna para el BVDV que provoquen una respuesta inmunitaria vigorosa y multifacética, y particularmente aquellas que provoquen una respuesta inmunitaria contra la forma Tipo 1b del BVDV. .

Debido a la posibilidad de una gran pérdida económica en hatos no vacunados, existe la necesidad de vacunas rentables (y preferiblemente de una sola dosis) que contengan el virus BVDV-1b vivo, modificado, que induzca profilaxis contra las infecciones por BVDV en poblaciones de ganado de mamíferos.

Asimismo, debido a que las vacunas polivalentes contemporáneas contra enfermedades multifactoriales tales como BRDC y las enfermedades relacionadas con la fiebre del embarque son en gran medida ineficaces para prevenir la infección por BVDV-1b, también existe la necesidad de mejorar las modalidades de vacunación para mejorar la profilaxis y el control del brote de la enfermedad en ganado susceptible al BVDV-1b.

**Breve resumen de la invención**

La presente invención abarca composiciones nuevas y útiles, así como procedimientos para su empleo que pueden mejorar ventajosamente la administración de agentes profilácticos y/o terapéuticos a un animal que lo necesite. La invención proporciona composiciones de vacunas que ofrecen ventajas sobre las formulaciones convencionales, y específicamente proporcionan formas de prevenir o controlar enfermedades causadas por uno o más pestivirus, y en particular, aquellas causadas por virus BVDV, incluidas las del subgenotipo Tipo 1b (es decir, BVDV-1b). El alcance de la invención está de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas.

En un sentido global y general, la presente invención abarca composiciones y procedimientos para su uso en la prevención, tratamiento y/o manejo de infecciones virales y/o microbianas, patogénesis y enfermedades. Las composiciones inmunogénicas divulgadas en el presente documento, así como los procedimientos que las emplean, encuentran un uso particular en la prevención, tratamiento y/o mejoría de uno o más síntomas de la fiebre del embarque/BRDC en mamíferos susceptibles utilizando las composiciones de vacunas de la invención y los procedimientos que las emplean que son superior para la prevención/tratamiento convencional de la fiebre del embarque actualmente disponibles en las artes médicas veterinarias.

En realizaciones particulares, la presente invención proporciona composiciones inmunogénicas que comprenden virus BVDV-1b vivos modificados, así como formulaciones farmacéuticas que los contienen, y procedimientos para usar tales vacunas en una variedad de regímenes profilácticos. Dichas composiciones y procedimientos encuentran uso particular en la prevención de enfermedades víricas y multifactoriales en animales tales como ganado mamífero que son susceptibles a la infección por el BVDV.

En realizaciones relacionadas, la invención también proporciona procedimientos para usar las composiciones de vacuna divulgadas para provocar una respuesta inmunológica específica al virus en un animal.

En un sentido global y general, tales procedimientos generalmente implican proporcionar a un animal seleccionado una o más de las composiciones inmunogénicas divulgadas en este documento en cantidad o cantidades y durante un tiempo efectivo para provocar una respuesta inmunológica específica al virus en un animal, y, en particular, una respuesta inmunológica específica al BVDV. En tales realizaciones, el animal es preferiblemente un mamífero de pezuña hendida, y más preferiblemente, un miembro de la familia *Bovidae*.

La invención también proporciona un procedimiento para prevenir o controlar un brote de infección o infecciones virales y/o microbianas (e infecciones pestivirales causadas por el BVDV y especies relacionadas en particular) en una o más poblaciones de mamíferos seleccionados. El procedimiento generalmente implica proporcionar a un miembro susceptible o en riesgo de tal población, una cantidad efectiva de una o más de las composiciones inmunogénicas o de vacuna divulgadas, durante un tiempo suficiente para retrasar, disminuir, reducir, inhibir y/o prevenir el brote de tal infección en la población general. Los ejemplos de poblaciones de mamíferos incluyen, sin limitación, miembros de los *Bovinae* y *Caprinae*, y en particular los de los géneros *Bison*, *Bos*, *Bubalus*, *Capra*, *Oreamnos*, *Ovibos*, *Ovis*, *Syncerus* y similares. En realizaciones ilustrativas, estos procedimientos son particularmente deseables en el tratamiento de ganado comercial en los géneros *Bison*, *Bos*, *Capra* y *Ovis*, incluyendo, sin limitación, *Bison bison*, *Bos taurus*, *Capra hircus* y *Ovis aries*.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para estimular el sistema inmune de un animal para producir una respuesta inmune protectora contra una infección viral, y en particular, una infección virulenta de pestivirus para *Bovidae*. Dicho procedimiento generalmente implica al menos administrar a un animal que lo necesite, una cantidad inmunológicamente y profilácticamente efectiva de una o más de las composiciones de vacuna divulgadas en una cantidad y durante un tiempo suficiente para estimular el sistema inmunológico del animal. En la práctica convencional de este procedimiento en una realización, la administración de una o más de las composiciones de vacuna inmunológica y profilácticamente activas divulgadas preferiblemente inducen al menos una primera cantidad detectable de anticuerpos antipestivirus en el animal, y más preferiblemente aún, induce al menos una primera cantidad detectable de anticuerpos anti-BVDV-1b en el animal. En realizaciones preferidas, la administración de la composición preferiblemente inmuniza al animal contra una infección inicial, posterior y/o recurrente por el virus BVDV-1b, y en ciertas realizaciones, también inmuniza preferiblemente al animal contra una infección inicial, posterior y/o recurrente por uno o más virus genéticamente similares o epitópicamente relacionados, incluidos, por ejemplo, uno o más tipos, cepas y subtipos del virus BVDV (incluidos, sin limitación, BVDV-1a, BVDV-2 y otros pestivirus genéticamente similares).

En otra realización más, la invención proporciona un procedimiento para producir una respuesta inmune protectora contra pestivirus en un animal. Dicho procedimiento generalmente incluye proporcionar a un animal que lo necesite una cantidad inmunológica y profilácticamente eficaz de una o más de las composiciones inmunogénicas de BVDV-1b divulgadas en condiciones y durante un tiempo suficiente para producir dicha respuesta inmune protectora contra una o más especies, subespecies o cepas de pestivirus, y preferiblemente, contra una o más especies, cepas, subtipos o serotipos del BVDV.

Asimismo, la invención también divulga un procedimiento para proporcionar una composición profiláctica o terapéutica a una primera célula en un huésped mamífero. Este procedimiento generalmente implica proporcionar a un mamífero que lo necesite una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de una o más de las composiciones inmunogénicas específicas del BVDV divulgadas en este documento, bajo condiciones y durante un tiempo efectivo para proporcionar la composición a al menos una primera célula, tejido, órgano u sistema de órganos en tal mamífero.

La presente invención también divulga un procedimiento para prevenir, tratar y/o mejorar uno o más síntomas de infección por el BVDV en un mamífero. Dicho procedimiento generalmente incluye proporcionar al mamífero que lo necesite una cantidad inmunológica y profilácticamente eficaz de una o más de las composiciones inmunogénicas del BVDV-1b divulgadas en condiciones y durante un tiempo suficiente para prevenir, tratar y/o mejorar uno o más síntomas de la infección por BVDV en el mamífero.

Asimismo, la presente invención también divulga procedimientos para prevenir, tratar y/o mejorar uno o más síntomas de una enfermedad multifactorial tal como BRDC en un mamífero, y particularmente en aquellas enfermedades en las cuales la infección por al menos un primer BVDV está implicada como un agente causal o contribuyente de la enfermedad. Dichos procedimientos generalmente implican administrar a un mamífero seleccionado al menos una primera cantidad inmunológica o profilácticamente eficaz de al menos una primera composición de vacuna anti-BVDV-1b en condiciones y durante un tiempo suficiente para prevenir, tratar y/o mejorar uno o más síntomas de la enfermedad en el mamífero.

En otro aspecto más, la invención proporciona un procedimiento para prevenir, tratar y/o mejorar uno o más síntomas de fiebre del embarque en un miembro de la familia *Bovidae*. Tal procedimiento generalmente incluye proporcionar al bóvido al menos una primera cantidad inmunológica o profilácticamente efectiva de una primera composición que comprende una población de virus BVDV-1b vivos modificados en condiciones y durante un tiempo suficiente para prevenir, tratar y/o mejorar uno o más síntomas de la fiebre del embarque en el bóvido.

### Composiciones inmunogénicas

Con el fin de proporcionar una protección más amplia contra uno o más pestivirus, y en particular, uno o más de los agentes virales implicados en el BRDC y fiebre del embarque en miembros de la familia *Bovidae*, los inventores han desarrollado formulaciones de vacunas seguras y eficaces que incluyen uno o más antígenos específicos para el BVDV-1b. Se han descrito formulaciones de vacunas tanto monovalentes como polivalentes, incluidas aquellas que contienen, en el caso de vacunas monovalentes, uno o más antígenos, epítomos o virus vivos modificados que provocan una respuesta inmunitaria específica para el BVDV solo o, en casos de vacunas polivalentes, uno o más antígenos, epítomos o virus vivos modificados que provocan respuestas inmunitarias específicas no solo para el BVDV, sino también para uno o más patógenos adicionales.

En realizaciones ilustrativas, se ha desarrollado una composición inmunogénica monovalente que comprende al BVDV-1b vivo modificado para proteger al ganado de la infección por BVDV-1b. Además, la presente invención también ha proporcionado composiciones inmunogénicas multivalentes específicas para BRDC y fiebre del embarque relacionadas, que incluyen una formulación ejemplar viral bovina viva modificada de seis vías (es decir, "hexavalente") que incluye componentes antigénicos para inducir específicamente una respuesta inmunitaria contra uno o más, preferiblemente dos o más, y más preferiblemente tres o más del BHV-1, PI<sub>3</sub>, BRSV, dos subgenotipos del BVDV tipo 1 (1a y 1b), y BVDV tipo 2 en un animal. En una realización más preferida, la formulación induce una respuesta inmune contra cada uno de los anteriores, típicamente a niveles variables.

En otras realizaciones, la invención proporciona formulaciones de vacunas que contienen los inmunógenos mencionados anteriormente, y procedimientos para su uso en la profilaxis, terapia y/o mejoría de uno o más síntomas de una infección por pestivirus en un animal, y en particular, una Infección por BVDV-1b en ganado mamífero. La invención abarca además formulaciones de vacunas y procedimientos que las emplean en la prevención, tratamiento y/o mejoría de uno o más síntomas de una fiebre del embarque, tal como BRDC, en bóvidos y otras especies de mamíferos relacionadas.

### Formulaciones de vacunas

La presente invención proporciona composiciones inmunogénicas y formulaciones de vacunas de las mismas para uso en la profilaxis de una o más infecciones virales, así como composiciones para uso en la prevención o terapia de uno o más complejos de enfermedades multifactoriales en un mamífero seleccionado. En particular, la invención proporciona el uso de una o más de las composiciones inmunogénicas divulgadas en la fabricación de medicamentos de vacuna para la profilaxis, prevención o terapia, y en particular para el uso en la fabricación de medicamentos aceptables para uso veterinario para prevenir, controlar, mejorar y/o el tratamiento de una o más enfermedades, o uno o más síntomas de dichas enfermedades, en mamíferos tales como infecciones por BVDV en ganado.

Las vacunas de la presente invención pueden administrarse por cualquier vía de administración adecuada para el mamífero seleccionado, disponible para un experto en la técnica, preferiblemente mediante inyección intramuscular o subcutánea o administración intranasal, oral, cutánea, percutánea o intracutánea. Preferiblemente, para vacunas contra el BVDV-1b, las vacunas se administran por vía subcutánea, o por vía intramuscular o intranasal, siendo la administración subcutánea la más preferida. Las vacunas se administran generalmente antes del destete, durante el destete o al momento de la entrada al pasto o al corral de engorde. Como parte de una operación de ganado adulto en curso, también se pueden emplear rutinariamente una o más dosis "de refuerzo" de dichas vacunas, incluso, por ejemplo, como parte de un programa de revacunación/mantenimiento anual.

Aunque las formulaciones farmacéuticas y las vacunas de la presente invención pueden prepararse en cualquier formulación adecuada, aceptable para uso veterinario, en realizaciones particulares, la invención proporciona vacunas que están en forma de una solución o suspensión lista para administrar, en una solución madre concentrada adecuada para la dilución antes de la administración, o en una forma reconstituible tal como una preparación liofilizada, secado por congelación o congelada, como es conocido por los expertos en la técnica médica veterinaria.

Tanto la preparación de las composiciones de pestivirus vivos modificadas como la formulación de las composiciones y vacunas de la invención con otros inmunógenos (con o sin uno o más adyuvantes), son convencionales en base a la guía de este documento, e incluyen la mezcla de pestivirus vivo atenuado, con un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, opcionalmente con otros inmunógenos y opcionalmente con un adyuvante.

Los portadores, diluyentes u otros componentes inertes o inactivos de las formulaciones farmacéuticas y vacunas pueden comprender uno o más estabilizantes, conservantes y/o reguladores, como pueden emplearse en las técnicas de medicina veterinaria. Los estabilizadores ejemplares incluyen, sin limitación, SPGA y uno o más de los siguientes: carbohidratos (incluidos, entre otros, sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrano, glutamato o glucosa), proteínas (incluidas, entre otras, leche seca, albúmina sérica, caseína o proteínas de otras fuentes como plantas o microorganismos), o similares. Los reguladores adecuados incluyen, sin limitación, uno o más fosfatos de metales alcalinos. Los conservantes ejemplares útiles en la formulación de las composiciones farmacéuticas y vacunas divulgadas incluyen, sin limitación, timerosal, mertiolate, gentamicina, neomicina, nistatina, anfotericina B, tetraciclina, penicilina, estreptomycin, polimixina B, y cualquier combinación de los mismos. Los diluyentes ejemplares incluyen, sin limitación, agua estéril, uno o más reguladores acuosos (tales como solución salina regulada y similares), uno o más alcoholes (incluyendo un poliol, por ejemplo, glicerol o similares), y cualquier combinación de los mismos.

Cuando se desee, las composiciones de vacuna de la presente invención también pueden incluir además opcionalmente uno o más adyuvantes. Los ejemplos no limitantes de compuestos y composiciones adecuados que tienen actividad adyuvante incluyen hidróxido de aluminio, fosfato u óxido, aceite en agua, agua en aceite, agua en aceite en agua, emulsiones basadas en, por ejemplo, un aceite mineral, tal como, sin limitación, Drakeol®, Bayol® o Marcol®; un aceite vegetal, tal como sin limitación, aceite de semilla de algodón, aceite de cacahuete o aceite de maíz; acetato de vitamina E; saponinas; un aceite de pescado, tal como, sin limitación, escualeno o escualano; o cualquier combinación de los mismos.

Las formulaciones de vacunas específicas del BVDV de acuerdo con la presente invención también pueden contener adicionalmente opcionalmente uno o más inmunógenos específicos para uno o más virus y/o microorganismos adicionales que también son potencialmente patógenos para el animal que se está inmunizando. Por ejemplo, en ganado y bovinos relacionados, los inmunógenos adicionales que pueden estar presentes en la composición pueden derivarse de una o más especies de virus patógenos bovinos, incluidos, entre otros, rotavirus, virus sincitiales respiratorios bovinos, herpesvirus bovino (incluido el tipo 1), coronavirus bovino, virus de parainfluenza (incluido el tipo 3), paramixovirus bovino o similares, o alternativamente, los que se derivan de una o más especies de microbios patógenos bovinos tales como, sin limitación, *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica* (anteriormente *Pasteurella haemolytica*) *Histophilus somni* (anteriormente *Haemophilus somnus*), *Mycoplasma bovis* y similares, o una combinación de cualquiera de los anteriores.

En algunas realizaciones, cuando sea relevante, como entendería un experto en la técnica, las composiciones inmunogénicas y vacunas de la presente invención pueden incluir la administración de una dosis única a un animal, o alternativamente, pueden incluir la administración de dosis múltiples, y/o sucesivas al animal a lo largo del tiempo. Alternativamente, las composiciones inmunogénicas de la presente invención también pueden coadministrarse con uno o más compuestos antivirales o antimicrobianos, ya sea solos o en combinación con la administración de uno o más inmunógenos o formulaciones de vacunas microbianas específicas.

Otro aspecto importante de la presente invención se refiere a procedimientos para usar las composiciones inmunogénicas divulgadas para administrar uno o más agentes terapéuticos para tratar o mejorar uno o más síntomas de una infección o enfermedad en un mamífero. Dichos procedimientos generalmente implican la administración a un mamífero que lo necesite, una o más de las composiciones inmunogénicas divulgadas, en una cantidad y durante un tiempo suficiente para tratar, mejorar o disminuir la gravedad, la duración o el alcance de dicha enfermedad o infección en tal mamífero.

Los procedimientos y composiciones de la invención también se pueden usar en la prevención, profilaxis y/o vacunación de un animal que tiene, se sospecha que tiene, esta en riesgo de desarrollar o se le ha diagnosticado una o más infecciones y/o enfermedades, ya sea antes, durante o después del diagnóstico o la aparición de uno o más síntomas clínicos de la enfermedad, o la aparición de uno o más síntomas de la misma.

5

**Procedimientos para inducir una respuesta inmune**

La presente invención incluye además procedimientos para inducir una respuesta inmune detectable contra uno o más patógenos virales en un animal susceptible. Un procedimiento preferido incluye administrar a un animal que lo necesite, o potencialmente necesitarlo en función de, por ejemplo, factores de riesgo conocidos para una enfermedad o infección dada, una cantidad de una composición de vacuna como se divulga en este documento, suficiente para inducir una respuesta inmune detectable en el animal.

10

En algunas realizaciones, la invención abarca procedimientos de vacunación de un sujeto contra una infección pestiviral, tal como BVDV, o contra una enfermedad multifactorial, tal como BRDC, en la que una infección pestiviral está o bien implicada o es causal. Dichos procedimientos generalmente implican administrar a un animal que lo necesite, una cantidad profiláctica y/o terapéuticamente efectiva de una composición de vacuna específica contra el pestiviral, y uno o más portadores, reguladores, diluyentes, vehículos, o productos farmacéuticamente o veterinarios aceptables, para proporcionar una respuesta inmune detectable en el animal contra una infección pestiviral, o una enfermedad causada o exacerbada por tal infección pestiviral.

15

20

Para este fin, la presente invención proporciona procedimientos para usar las composiciones inmunogénicas y formulaciones de vacunas divulgadas para la profilaxis, tratamiento, mejora o manejo de una o más enfermedades o infecciones virales o microbianas en un animal, o uno o más de sus síntomas.

25

La presente invención también proporciona el uso de una o más de las composiciones inmunogénicas divulgadas en la fabricación de un medicamento o vacuna veterinaria para la profilaxis o prevención de enfermedades, incluyendo, en la preparación de una o más vacunas adecuadas para administración profiláctica para prevenir o mejorar uno o más síntomas de una infección pestiviral, incluido, por ejemplo, el BVDV, en un animal.

30

La invención también proporciona procedimientos para suministrar un compuesto inmunogénico terapéutico o profiláctico a una primera célula en un mamífero, y el procedimiento generalmente incluye proporcionar a un mamífero que lo necesite, una cantidad eficaz de una composición inmunogénica del BVDV como se divulga en el presente documento que incluye una pluralidad de partículas virales vivas modificadas como ingrediente activo, durante un tiempo efectivo para proporcionar la terapia y/o profilaxis deseadas en el mamífero inmunizado o tratado.

35

**Kits terapéuticos y profilácticos**

Los Kits incluyen una o más de las composiciones inmunogénicas o formulaciones farmacéuticas divulgadas que las incluyen; y las instrucciones para usar el kit en uno o más regímenes profilácticos o terapéuticos también representan aspectos ilustrativos de la presente divulgación. Dichos kits incluyen preferiblemente una o más de las composiciones o vacunas inmunogénicas divulgadas, ya sea solas o en combinación con uno o más compuestos terapéuticos adicionales, productos farmacéuticos y similares, e instrucciones para el uso de los componentes en la prevención o tratamiento de enfermedades en un animal. Los kits de acuerdo con la invención pueden envasarse para su distribución comercial, y también pueden incluir además opcionalmente uno o más dispositivos de administración (por ejemplo, jeringas, viales, inyectables o similares) para administrar la composición o composiciones al animal seleccionado.

40

45

El contenedor o contenedores para tales kits pueden incluir típicamente al menos un vial, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro contenedor, en el cual se pueden colocar la composición o composiciones inmunogénicas o formulación o formulaciones de vacuna, y, preferiblemente, adecuadamente dispensadas en una o más alícuotas para su administración a un animal. Cuando también se desea una segunda composición inmunogénica o un primer compuesto antiviral o antimicrobiano, el kit también puede contener la segunda composición inmunogénica o el primer compuesto antiviral o antimicrobiano en un segundo contenedor distinto, o en un solo contenedor con una barrera rompible o irrompible para aislar los dos componentes hasta la preparación para administración. Alternativamente, se puede preparar una pluralidad de composición o composiciones inmunogénicas distintas y/o compuesto o compuestos antivirales o antimicrobianos distintos en una sola formulación y se pueden empacar en un solo contenedor, vial, matraz, jeringa, catéter, cánula, botella, tubo de ensayo, ampolla u otro contenedor adecuado. El kit también puede incluir un contenedor más grande, tal como un estuche, que incluye los contenedores mencionados anteriormente, junto con otros equipos y similares. Si se desea, pueden incluirse múltiples dosis en un recipiente adecuado dentro del contenedor, preferiblemente junto con cualquier dispositivo de medición volumétrica o de peso adecuado para medir una dosis preseleccionada según sea necesario.

50

55

60

**Composiciones para uso en la preparación de medicamentos**

65

Otro aspecto importante de la presente invención se refiere a procedimientos para usar las composiciones inmunogénicas divulgadas (así como formulaciones que las incluyen) en la preparación de medicamentos para prevenir, tratar o mejorar una enfermedad, o los síntomas de la misma, en un animal, tal como un mamífero vertebrado. El uso de las composiciones inmunogénicas divulgadas también se contempla en la terapia y/o la profilaxis de una o más enfermedades de origen microbiano o viral.

Dicho uso generalmente implica la administración a un animal que lo necesite, de una o más de las composiciones inmunogénicas divulgadas en una cantidad y durante un tiempo suficiente para prevenir, tratar o controlar una o más enfermedades o síntomas de las mismas en el animal afectado. Las composiciones que incluyen una o más de las formulaciones inmunogénicas divulgadas también forman parte de la presente invención, y particularmente aquellas composiciones que incluyen además al menos un primer excipiente farmacéuticamente aceptable para uso en la terapia o profilaxis de una o más enfermedades de origen viral y/o microbiana.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden prepararse como vacunas univalentes (es decir, monovalentes), o alternativamente, como vacunas bivalentes, trivalentes o incluso multivalentes (es decir, polivalentes). Por ejemplo, una vacuna monovalente incluirá preferiblemente una composición inmunogénica única de la presente invención (por ejemplo, una población de virus BVDV-1b vivos modificados) que sea capaz de provocar una respuesta inmune anti-BVDV específica cuando se introduce en el cuerpo de un mamífero receptor seleccionado, y particularmente mamíferos que son susceptibles a la infección por BVDV.

De manera similar, una composición de vacuna bivalente incluirá preferiblemente al menos una primera composición específica de BVDV-1b, y al menos un segundo inmunógeno específico de virus o microbios, cada uno capaz de provocar una respuesta inmune específica en un mamífero. Las composiciones de vacunas multivalentes (incluyendo trivalentes o polivalentes) preferiblemente incluirán tres o más inmunógenos específicos virales o microbianos, respectivamente. En una realización ilustrada en este documento, los inventores desarrollaron una sorprendente, e inesperadamente ventajosa formulación de vacuna viva hexavalente (de seis vías) que comprende inmunógenos específicos para BVDV-1b, BVDV Tipo 1a (BVDV-1a), BVDV Tipo 2 (BVDV-2), PI<sub>3</sub>, virus sincitial respiratorio bovino (BRSV), y BHV-1, el agente causal de la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR), para controlar la infección por BRDC en poblaciones de mamíferos, y particularmente en el ganado doméstico.

#### **Descripción de realizaciones ilustrativas**

Las realizaciones ilustrativas de la invención se describen a continuación. En aras de la claridad, no todas las características de una implementación real se describen en esta memoria descriptiva. Por supuesto, se apreciará que en el desarrollo de cualquier realización real, deben tomarse numerosas decisiones específicas de implementación para lograr los objetivos específicos de los desarrolladores, como el cumplimiento de restricciones relacionadas con el sistema y relacionadas con el negocio, que variarán de una implementación a otra. Además, se apreciará que tal esfuerzo de desarrollo podría ser complejo y requerir mucho tiempo, pero sería una tarea rutinaria para los expertos en la técnica que tienen el beneficio de esta divulgación.

#### **"Fiebre del embarque"**

"Fiebre del embarque" es un término dado a un síndrome septicémico agudo y altamente contagioso en bovinos y ovinos que se caracteriza clínicamente por fiebre, inflamación aguda de las vías respiratorias, secreción nasal, anorexia, depresión, neumonía fibrinosa y necrosis de los tejidos infectados. Lo más frecuentemente encontrado en los lotes de engorde después del traslado es la fiebre del embarque que es la principal causa de muerte entre el ganado joven, y es responsable de una pérdida anual estimada en la industria de más de 500 millones de dólares. Solo en 1991, se estimó que la fiebre del embarque costó a la industria ganadera de los Estados Unidos casi \$ 624 millones, debido principalmente a los costos del tratamiento, la pérdida de producción y la muerte.

En general, se considera que la patogenia de la fiebre del embarque involucra influencias externas adversas que predisponen al animal a una infección respiratoria viral inicial, que, a su vez, produce condiciones favorables para la proliferación de una o más infecciones bacterianas secundarias.

#### **Complejo de la enfermedad respiratoria bovina (BRD) (BRDC)**

El agente causal principal de la fiebre del embarque es una afección multifactorial conocida como enfermedad respiratoria bovina (BRD) o complejo de enfermedad respiratoria bovina (BRDC). El BRDC, una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria del ganado de carne, se caracteriza por la infección simultánea o secuencial por patógenos virales y bacterianos. Los patógenos virales implicados en BRDC incluyen el virus del herpes bovino 1 (BHV-1), la PI<sub>3</sub> bovina, el virus de la diarrea viral bovina (BVDV) y el virus sincitial respiratorio bovino (BRSV).

Después de la infección viral, los animales afectados desarrollan una o más infecciones bacterianas subsiguientes (por ejemplo, *Mannheimia* [anteriormente *Pasteurella*] *haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*

[anteriormente *Haemophilus somnus*], *Actinomyces pyogenes*, y *Mycoplasma* spp. diversos) que a menudo se manifiestan en neumonía aguda.

El signo clínico más común y más temprano reconocible de neumonía es la depresión. Los terneros que presenten depresión tendrán orejas caídas, una cabeza extendida, una espalda inclinada y/o a menudo se aislarán de otros bovinos. A medida que la salud de los terneros se deteriora progresivamente, dejan de alimentarse, presentan una mayor frecuencia respiratoria y desarrollan una fiebre pronunciada (generalmente en el intervalo de 40°-42,2°C).

### **Pestivirus**

Los pestivirus causan enfermedades económicamente importantes en animales de todo el mundo. El género pestivirus, dentro de la familia Flaviviridae, comprende tres especies de virus de ARN de sentido positivo monocatenario: virus de la diarrea viral bovina (BVDV), virus de la fiebre porcina clásica (CSFV), virus de la enfermedad fronteriza (BDV). Recientemente, se identificó un cuarto grupo distinto de pestivirus que está relacionado genéticamente con el BVDV, y se menciona en la literatura como virus de la diarrea viral bovina tipo 2 (BVDV-2) (véase, por ejemplo, Thiel et al., 1996; y Becher et al., 1995; cada uno de los cuales se incorpora específicamente en el presente documento en su totalidad por referencia expresa al mismo). En consecuencia, los textos contemporáneos ahora se refieren a las especies originales de BVDV como "BVDV-1" para distinguir entre las dos especies.

### **Virus de la diarrea viral bovina (BVDV)**

La especie de tipo *Pestivirus* es BVDV Tipo 1 (BVDV-1), cuyo genoma tiene una longitud de aproximadamente 12,5 kb y contiene un gran marco de lectura abierto (ORF) (Collett et al., 1988, específicamente incorporado aquí en su totalidad por referencia expresa al mismo). El ORF codifica una poliproteína grande de aproximadamente 450 kDa que se procesa de forma conjunta y posterior a la traducción por el huésped o proteasas virales. El extremo N-terminal de la poliproteína estándar del BVDV da como resultado una proteína no estructural p20 (Npro), proteína p14 de la cápside (C); glicoproteínas de la envoltura gp48 (E0), gp25 (E1), gp53 (E2); proteínas no estructurales p125 (NS23), p10 (NS4A), p32 (NS4B), p58 (NS5A) y p75 (NS5B) (véase, por ejemplo, Tautz et al., 1997; Xu et al., 1997; Elbers et al., 1996 y Wiskerchen et al., 1991, cada uno de los cuales se incorpora específicamente en el presente documento en su totalidad por referencia expresa a los mismos). BVDV-1 existe en dos biotipos, citopático (designado "cp") o no citopático ("ncp"), que difieren en la producción de un solo polipéptido de 80 kDa (proteína no estructural p80, NS3) en la variante citopática (véase, por ejemplo, Gillespie et al., 1960, específicamente incorporado en este documento en su totalidad por referencia expresa al mismo).

Según el análisis filogenético de varios aislados de BVDV, se ha demostrado que BVDV-1 comprende al menos 13 subgenotipos distintos (designados BVDV-1a hasta BVDV-1i), mientras que dos subgenotipos (BVDV-2a y BVDV-2b) se han identificado para el BVDV-2 (véase, por ejemplo, Pellerin et al., 1994; Ridpath et al., 1994, y Xue et al., 2010; cada uno de los cuales se incorpora específicamente en este documento en su totalidad por referencia expresa a los mismos).

El BVDV-1 y el BVDV-2 causan infecciones agudas en el ganado (diarrea, fiebre, síndrome hemorrágico) y, si la infección ocurre durante el embarazo, aborto, malformación del feto e infección persistente de los terneros. Los animales infectados persistentemente representan el reservorio principal del virus, y estos animales pueden sufrir la enfermedad mortal de la mucosa (DM).

El BVDV está estrechamente relacionado con los virus que causan enfermedades fronterizas en ovinos y la fiebre porcina clásica en porcinos. El ganado infectado presenta típicamente una "enfermedad de la mucosa" generalizada que se caracteriza por elevadas temperaturas, diarrea, tos y ulceraciones de la mucosa alimentaria (véanse, Olafson et al., 1946 y Ramsey et al., 1953, cada una de las cuales incorporado específicamente en el presente documento en su totalidad por referencia expresa a los mismos).

El virus BVD es capaz de atravesar la placenta de las vacas preñadas y puede dar lugar al nacimiento de terneros infectados persistentemente (PI) que son inmunotolerantes al virus y persistentemente virémicos por el resto de sus vidas. Estos ganado con PI, que están altamente predispuestos a la infección con microorganismos que causan neumonía o enfermedad entérica, proporcionan los reservorios virales necesarios para los brotes de enfermedad por DM en el ganado (véase, por ejemplo, Liess et al., 1974; Barber et al., 1985; Malmquist, 1968 y Ross et al., 1986, cada uno de los cuales se incorpora específicamente en el presente documento en su totalidad por referencia expresa a los mismos).

El BVDV se propaga a través de un hato de manera oral y fecal, y las estrategias para el control del virus van desde prácticas de manejo más estrictas en un esfuerzo por simplemente reducir la pérdida económica, para elaborar procedimientos de prueba para identificar animales infectados que, aunque son efectivos, normalmente conllevan un nivel de costo inaceptable.



En los últimos treinta años, casi ciento cincuenta vacunas para BVDV, tanto virus vivos modificados (MLV) como virus o partículas virales atenuadas inactivadas, se han comercializado para la industria ganadera con diversos grados de éxito; los brotes de BVDV todavía se informan anualmente a pesar de la disponibilidad y el uso generalizados de formulaciones de vacunas comerciales. Los enfoques actuales para el manejo de la enfermedad implican una inoculación anual repetida con la vacuna para el ganado, y generalmente se toman medidas adicionales para asegurar que no nazcan los terneros como portadores de PI. Se han desarrollado varios procedimientos de prueba diferentes para la detección de BVDV y/o la detección de animales infectados con BVDV, que incluyen la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR), el inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA) y las técnicas estándar de aislamiento de virus y varios ensayos inmunohistoquímicos.

## Definiciones ejemplares

Los términos "alrededor de" y "aproximadamente" como se usan en este documento, son intercambiables, y en general se debe entender que se refieren a un intervalo de números alrededor de un número dado, así como a todos los números en un intervalo mencionado de números (por ejemplo, "aproximadamente 5 a 15" significa "aproximadamente 5 hasta aproximadamente 15" a menos que se indique lo contrario). Además, debe entenderse que todos los intervalos numéricos en este documento incluyen todos los números enteros dentro del intervalo. Como se usa en este documento, el término "antígeno" o "inmunógeno" significa una sustancia que induce una respuesta inmune específica en un animal huésped. El antígeno puede comprender un organismo completo, muerto, atenuado o vivo; una subunidad o porción de un organismo; un vector recombinante que contiene un inserto con propiedades inmunogénicas; una pieza o fragmento de ADN capaz de inducir una respuesta inmune tras la presentación a un animal huésped; una proteína, un polipéptido, un péptido, un epítipo, un hapteno, o cualquier combinación de los mismos. Alternativamente, el inmunógeno o antígeno puede comprender una toxina o antitoxina. Un antígeno generalmente abarca cualquier sustancia inmunogénica, es decir, cualquier sustancia que provoque una respuesta inmune (por ejemplo, la producción de moléculas de anticuerpos específicos) cuando se introduce en los tejidos de un animal susceptible, y que es capaz de unirse específicamente a un anticuerpo que se produce en respuesta a la introducción del antígeno. Un antígeno es capaz de ser reconocido por el sistema inmune, induciendo una respuesta inmune humoral, y/o induciendo una respuesta inmune celular que conduce a la activación de los linfocitos B y/o T. Un antígeno puede incluir un solo epítipo, o dos o más epítipos.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que se une a otras moléculas (antígenos) a través de los dominios variables de la cadena ligera y pesada,  $V_H$  y  $V_L$ , respectivamente. El término "anticuerpo" se refiere a cualquier molécula de inmunoglobulina, incluyendo, por ejemplo, pero sin limitarse a, IgM, IgG, IgA, IgE, IgD, y cualquier subclase de las mismos o una combinación de las mismos. El término "anticuerpo" también significa un fragmento funcional de moléculas de inmunoglobulina, que incluye, por ejemplo, pero no se limita a fragmentos, Fab, Fab', (Fab')<sub>2</sub>, Fv, Fd, scFv y sdFv, a menos que se indique expresamente lo contrario.

Como se usa en este documento, un "polipéptido antigénico" o un "polipéptido inmunogénico" es un polipéptido que, cuando se introduce en un vertebrado, reacciona con las moléculas del sistema inmunitario del vertebrado, es decir, es antigénico, y/o induce una respuesta inmune en el vertebrado, es decir, es inmunogénico. Los polipéptidos antigénicos e inmunogénicos aislados de la presente invención, además de los codificados por los polinucleótidos de la invención, pueden proporcionarse como una proteína recombinante, una subunidad purificada, un vector viral que expresa la proteína, o pueden proporcionarse en forma de una vacuna de virus inactivado, por ejemplo, una vacuna de virus vivo atenuado, una vacuna de virus destruido por calor, etc.

Como se usa en el presente documento, una "vacuna viva modificada" es una vacuna que comprende un virus que se ha alterado, generalmente mediante el pasaje en células de cultivo de tejidos, para atenuar su capacidad de causar enfermedad, pero que conserva su capacidad de proteger contra la enfermedad o infección cuando posteriormente se administra a un animal.

Como se usa en este documento, un "adyuvante" significa una composición que comprende una o más sustancias que aumenta la inmunogenicidad y la eficacia de un virus o antígeno vivo modificado, cuando está presente en una composición de vacuna que contiene una población de tales virus, o una pluralidad de tales antígenos.

Como se usa en este documento, una "unidad infecciosa" de un virus se define como una TCID<sub>50</sub>, o la cantidad requerida para infectar o matar el 50% de un cultivo tisular de células susceptibles.

Como se usa en el presente documento, el término "portador" pretende incluir cualquier disolvente o disolventes, medio de dispersión, recubrimiento o recubrimientos, diluyente o diluyentes, regulador o reguladores, agente o agentes isotónicos, solución o soluciones, suspensión o suspensiones), coloide o coloides, inerte o inertes o similares, o una combinación de los mismos que sea farmacéuticamente aceptable para la administración al animal relevante. El uso de uno o más vehículos de administración para compuestos químicos en general, e inmunógenos en particular, es bien conocido por los expertos en la técnica farmacéutica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones diagnósticas, profilácticas y terapéuticas. Uno o más ingrediente o ingredientes activos suplementarios también

pueden incorporarse, o administrarse en asociación con, uno o más de las composiciones inmunogénicas divulgadas y las formulaciones de vacunas de los mismos.

Como se usa en el presente documento, los términos "inmunizar" o "inmunización" o términos similares se refieren a conferir la capacidad de montar una respuesta inmune detectable, o preferiblemente, sustancial contra un epítipo o inmunógeno antigénico específico. Estos términos no necesariamente infieren inmunidad completa, sino que se produce una respuesta inmune que es sustancialmente mayor que la línea base, por ejemplo, cuando no se administran composiciones inmunogénicas de la invención o cuando se administra una vacuna convencional. Por ejemplo, se considera que un mamífero está inmunizado contra uno o más inmunógenos objetivo, si se produce una respuesta inmune celular y/o humoral al inmunógeno o inmunógenos objetivo (y preferiblemente una respuesta inmune sustancial) después de la administración de las composiciones de vacunas divulgadas en este documento.

Como se usa en el presente documento, el término "respuesta inmunológica" a una composición o vacuna denota el desarrollo de una respuesta inmunitaria celular y/o mediada por anticuerpos en el animal huésped. En general, una respuesta inmunológica incluye (pero no se limita a) uno o más de los siguientes efectos: (a) la producción de anticuerpos; (b) la producción de células B; (c) la producción de células T auxiliares; y/o (d) la producción de células T citotóxicas, que se dirigen específicamente a un antígeno o hapteno dado.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunogénico" también se refiere a una sustancia, tal como una secuencia de aminoácidos, una porción de una secuencia de aminoácidos dentro de una proteína, polipéptido o péptido, o un virus vivo o muerto modificado o atenuado que provoca una respuesta inmunológica en un animal huésped. Como se usa en el presente documento, el término "proteína inmunogénica", "péptido inmunogénico" o "polipéptido inmunogénico" se refiere a proteínas, péptidos y polipéptidos que son inmunológicamente activos en el sentido de que una vez administrado al huésped, es capaz de provocar una respuesta inmune del tipo humoral y/o celular dirigida contra la proteína. El término epítipo se refiere a un sitio de proteína capaz de inducir una reacción inmune de tipo humoral (células B) y/o de tipo celular (células T).

El término "patógeno" se define en el presente documento como cualquier tipo de agente infeccioso, incluyendo, por ejemplo, virus, priones, protozoos, parásitos, así como microbios tales como bacterias, levaduras, mohos, hongos y similares.

Como se usa en este documento, el término "individuo" (también denominado indistintamente "huésped", "sujeto", "receptor", "paciente", etc.) se refiere a cualquier animal que pueda recibir uno o más de las composiciones farmacéuticas o formulaciones de vacunas divulgadas en el presente documento. Preferiblemente, el sujeto es un animal vertebrado, que pretende denotar cualquier especie animal (y preferiblemente, una especie de mamífero). En ciertas realizaciones, el individuo es preferiblemente cualquier huésped mamífero, que incluye, entre otros, primates no humanos, bovinos, caninos, caprinos, cavinos, corvinas, epinos, equinos, felinos, hircinos, lapinas, leporinas, altramuces, ovinos, porcinos, racinos, vulpinos y similares, incluyendo ganado, especímenes zoológicos, exóticos, así como animales de compañía, mascotas y cualquier animal al cuidado de un veterinario.

Las frases "veterinariamente aceptable" y "farmacéuticamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que no producen una reacción alérgica o adversa similar cuando se administran a un mamífero. Como se usa en este documento, "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que retiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no imparte ningún efecto toxicológico no deseado. Los ejemplos de tales sales incluyen, pero no se limitan a, sales de adición de ácido formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; y sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido pamoico, embónico), ácido algínico, ácido naftoico, ácido poliglútamico, ácidos naftalensulfónicos, ácidos naftalenodisulfónicos, ácido poligalacturónico; sales con cationes de metales polivalentes tales como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio y similares; sales formadas con un catión orgánico formado a partir de N,N'-dibenciletilendiamina o etilendiamina; y combinaciones de los mismos.

Como se usa en este documento, una "respuesta inmune protectora" o "respuesta inmune terapéutica" se refiere a una respuesta CTL y/o HTL a un antígeno, que de alguna manera previene o al menos detiene parcialmente la enfermedad, o los síntomas, efectos secundarios o progresión de los mismos. La respuesta inmune también puede incluir una respuesta de anticuerpos que ha sido facilitada por la estimulación de las células T auxiliares.

Como se usa en el presente documento, el término "vacuna" se refiere a una composición o formulación que contiene una composición inmunogénica de la presente invención en una forma que puede administrarse a un vertebrado, y preferiblemente a un animal tal como un mamífero. Típicamente, las vacunas de la presente invención incluirán una o más de las composiciones inmunogénicas (que incluyen una o más partículas víricas modificadas, vivas o una pluralidad de las mismas) divulgadas en este documento, formuladas para la administración a un animal que las necesite. Dichas composiciones pueden ser de cualquier formulación adecuada, incluyendo, sin limitación, las preparadas en un vehículo acuoso, así como aquellas en forma congelada, secadas por congelación liofilizadas, o deshidratadas que luego se rehidratan o suspenden posteriormente en un vehículo farmacéuticamente aceptable convencional (por ejemplo, solución salina estéril o una solución acuosa regulada similar) antes de la administración. En tales formas, las composiciones de vacuna de la presente invención pueden fabricarse en alícuotas de dosis

únicas o múltiples convenientes que pueden emplearse fácilmente en uno o más de los procedimientos o regímenes de vacunación divulgados en el presente documento para prevenir, gestionar o bien tratar una o más afecciones o uno o más síntomas de infección viral y/o microbiana en un animal susceptible.

5 Tras la introducción en el huésped animal, las composiciones inmunogénicas y las vacunas que las comprenden pueden provocar una respuesta inmune, y preferiblemente una respuesta inmune que es específica para el antígeno o antígenos introducidos, de modo que la respuesta inmunitaria resultante sea fácilmente detectable utilizando ensayos convencionales conocidos por los expertos en la técnica inmunológica, incluidos, entre otros, los ensayos que detectan la producción de anticuerpos específicos, citoquinas y/o la activación de células T citotóxicas, células presentadoras de antígenos, células T auxiliares, células dendríticas y/u otras respuestas celulares dentro de las células y tejidos del animal vacunado. Las composiciones de vacuna de la presente invención pueden incluir, o administrarse concomitantemente en o con, uno o más adyuvantes solos, o en combinación con uno o más antígenos adicionales o similares.

15 Las vacunas y composiciones inmunogénicas de la presente invención confieren una respuesta inmune a un animal después de la inmunización. Como se usa en el presente documento, el término "respuesta inmune" se refiere a una respuesta inmune humoral y/o respuesta inmune celular que conduce a la activación o proliferación de linfocitos B y/o T. Sin embargo, en algunos casos, las respuestas inmunes pueden ser de baja intensidad y ser detectables solo cuando se usa al menos una sustancia de acuerdo con la invención, mientras que otras pueden requerir la administración repetida, un adyuvante, un segundo o agente activo adicional, o una o más combinaciones de los mismos. El término "adyuvante" se refiere a un agente utilizado para estimular el sistema inmunológico de un organismo vivo, de modo que una o más funciones del sistema inmunitario se incrementan y se dirigen hacia el agente inmunogénico.

25 Como se usa en el presente documento, los términos "tratamiento", "tratar", "tratado (a)" o "que trata" se refieren a la terapia o la mejora de uno o más síntomas de una enfermedad, o la reducción en el grado o la gravedad de la enfermedad, o un síntoma de la misma, ya sea antes o después de que su desarrollo, aflija a un animal susceptible. Cuando se usa con respecto a una enfermedad infecciosa, por ejemplo, los términos se refieren a un tratamiento o régimen de tratamiento que disminuye la gravedad de la infección o disminuye o aminora o retrasa uno o más síntomas de la enfermedad atribuibles a la infección, así como el aumento de la capacidad del animal infectado para combatir la infección, incluyendo, por ejemplo, la reducción y/o eliminación de la infección del cuerpo del individuo tratado, o para disminuir o prevenir que la enfermedad empeore o se propague a otros animales que entren en contacto con el animal afectado.

35 El término "cantidad inmunogénicamente eficaz" tiene su significado habitual en la técnica, es decir, una cantidad de un inmunógeno que es capaz de inducir una respuesta inmune que se une significativamente con agentes patógenos que comparten características inmunológicas con el inmunógeno. Este término también puede abarcar cantidades terapéuticas o profilácticamente eficaces, o ambas.

40 Como se usa en este documento, los términos "prevención", "prevenir", "previene", "que previene", "vacunar" y "vacunación" se refieren a la profilaxis o a la inhibición parcial o completa de la infección, o a la reducción o retraso en el inicio de una o más enfermedades, o uno o más síntomas de la misma, en un animal que puede estar predispuesto a ella, pero que aún no ha sido expuesto a ella o se le ha diagnosticado que la tiene. Cuando se usa con respecto a una enfermedad infecciosa, por ejemplo, los términos se refieren a la administración profiláctica de una o más de las composiciones inmunogénicas de la invención, que tiende a aumentar la resistencia de un animal a la infección con uno o más patógenos virales o microbianos o, en otras palabras, disminuye la probabilidad de que el sujeto se infecte con el patógeno o patógenos o, si está infectado, retrasará los síntomas, disminuirá la gravedad de la infección o disminuirá los síntomas de enfermedad atribuibles a la infección, o cualquier combinación de los mismos en el animal infectado.

50 Cada uno de "prevención" y "tratamiento" incluyen el manejo de una infección, enfermedad, afección o síntoma particular del mismo en un animal, así como cualquier modificación beneficiosa del estado del candidato o el curso de la enfermedad o afección, o cualquiera síntoma de los mismos. El manejo puede abordar algunos o todos los síntomas del mismo con o sin afectar realmente la infección subyacente o cualquier enfermedad o afección que resulte de la misma.

El término "por ejemplo", tal como se usa en el presente documento, se usa meramente a modo de ejemplo, sin la limitación prevista, y no debe interpretarse como que se refiera solo a aquellos elementos enumerados explícitamente en la memoria descriptiva.

60 De acuerdo con la antigua convención de la ley de patentes, las palabras "un" y "uno, una" cuando se usan en esta solicitud, incluidas las reivindicaciones, denotan "uno o más".

### Ejemplos

65 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones ilustrativas de la invención. Los expertos en la técnica deberán apreciar que las técnicas divulgadas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas

que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deben, a la luz de la presente divulgación, apreciar que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se divulgan y seguir obteniendo un resultado parecido o similar sin apartarse del espíritu y alcance de la invención.

### **Ejemplo 1 - Producción de virus BVDV vivos modificados**

El presente Ejemplo proporciona un procedimiento ilustrativo para la producción a gran escala de BVDV-1b virus vivos modificados (MLV).

#### **Materiales y procedimientos**

##### **Virus y microorganismos**

La cepa TGAC de BVDV-1b se obtuvo del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA), del Servicio de Inspección de Sanidad Animal y Vegetal (APHIS), del Centro para el Laboratorio de Productos Biológicos Veterinarios (CVB-L) (Ames, IA, EE. UU.). La semilla maestra (MS) se denominó posteriormente como "**TVL-BVDV1b MS 04/27/2007 DW3-095**", y como se indica en la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos pendiente junto con la presente de los mismos solicitantes No. 61/427.404, presentada actualmente en este documento, ha sido depositada bajo condiciones que aseguran que el acceso a los cultivos estará disponible durante el período de espera de esta solicitud de patente para alguien determinado por el Comisionado de Patentes y Marcas que tiene derecho al mismo bajo el título 37 del C.F.R. párrafo § 1.14 y título 35 del U.S.C. párrafo § 122. El depósito está disponible según lo exigen las leyes de patentes extranjeras en los países donde se presentan las contrapartes de la solicitud en cuestión, o su progenie. Sin embargo, debe entenderse que la disponibilidad de un depósito no constituye una licencia para practicar la invención en cuestión, en detrimento de los derechos de patente otorgados por acción gubernamental. El depósito del cultivo en cuestión se almacenará y se pondrá a disposición del público de conformidad con las disposiciones del Tratado de Budapest para el Depósito de Microorganismos, es decir, se almacenará con toda el cuidado necesario para mantenerlo viable y no contaminado durante un período de por lo menos cinco años después de la solicitud más reciente para completar la muestra del depósito, y en cualquier caso, por un período de al menos 30 (treinta) años después de la fecha del depósito o por la vigencia de vida de cualquier patente que pueda divulgar el cultivo depositado. El depositante reconoce el deber de reemplazar el depósito en caso de que el depositario no pueda proporcionar una muestra cuando se le solicite, debido a la condición del depósito. Todas las restricciones sobre la disponibilidad al público del depósito del cultivo en cuestión se eliminará irrevocablemente en el momento de la concesión de una patente que lo divulgue. Un depósito del virus **TVL BVDV1b MS 04/27/2007 DW3-095** se ingresó en la colección permanente del Patents Depository of the American Type Culture Laboratory, ubicado en 10801 University Blvd., Manassas, VA, 20110-2209, EE.UU., el 21 de diciembre de 2010, bajo los términos del Tratado de Budapest, se le asignó el número de acceso ATCC PTA-11553 por parte del repositorio.

La identidad del virus MS (MSV) se realizó mediante un ensayo de reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) para identificar positivamente el virus MS como BVDV-1b. El protocolo para la diferenciación del BVDV por PCR fue desarrollado por Ridpath y Bolin, 1998 (incorporado específicamente en este documento en su totalidad por referencia expresa al mismo). La identificación positiva se realizó utilizando un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) (McNulty et al., 1984). La replicación de estos virus en células de riñón bovino en el laboratorio veterinario de Texas (TVL-BK) produjo cambios citopatológicos fácilmente reconocibles.

##### **Frecuencia de identificación de microorganismos**

Antes de la inoculación de células TVL-BK con virus semilla de producción, las células se visualizaron microscópicamente para confirmar que las células están mostrando la morfología descrita anteriormente. Antes de recolectar cada lote de virus de producción, se observa que las células TVL-BK confirman que están exhibiendo los efectos citopatológicos (CPE) típicos asociados con el virus.

##### **Virulencia, mantenimiento y gama de cultivos o subcultivos**

La consistencia de la virulencia, potencia y antigenicidad del BVDV-1b utilizado en esta vacuna se fomentó mediante el almacenamiento en estado liofilizado o congelado, y restricciones en el número de pases o subcultivos.

Intervalo: Virus de producción = MSV + 10 (eficacia de pases en serie), pero puede ser cualquier pase entre 5 y 10. Patrón de células de producción = MCS + 20 (eficacia de pases en serie), pero también puede ser cualquier pase por debajo de 20.

##### **Composición y reacción del medio utilizado en cultivos de semillas y producción**

La composición y la reacción del medio utilizado en los cultivos de semilla y producción fueron las siguientes: inóculos de virus de trabajo (MSV + 1 a MSV + 8) e inóculo de virus de producción (que fue típicamente, pero no exclusivamente, en MSV + 9), fueron propagados en células TVL-BK; siempre que el número de pases de las

células TVL-BK para la propagación del virus no exceda los 20 pases de MCS. El medio de crecimiento (tanto para preparaciones de trabajo como para células de producción) fue el medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM).

El MSV resultante puede almacenarse liofilizado, en medio de crioconservación almacenado en nitrógeno líquido, o en medio de crioconservación almacenado a una temperatura de -70 a -85°C. El MCS se puede almacenar en medio de crioconservación (en nitrógeno líquido), o en medio de crioconservación almacenado a una temperatura de -70 a -85°C.

#### Procedimientos de preparación de suspensiones para siembra e inoculación

Los crioviales que contenían células congeladas TVL-BK se descongelaron rápidamente. Los matraces de cultivo se llenaron hasta la capacidad recomendada con medio y las células suspendidas se transfirieron asépticamente desde los crioviales al matraz de cultivo. Los recipientes de cultivo también se sembraron mediante la división de cultivos de propagación activa en una proporción que oscila entre 1:3 a 1:6 (cm<sup>2</sup>: cm<sup>2</sup>). La TVL-BK en frascos o botellas de rodillos, que estaban destinadas a subcultivos, se liberaron de la superficie de cultivo mediante la eliminación aséptica del medio de crecimiento y la adición de una solución de tripsina-EDTA 1X. Después de la incubación (5 min, de 35 a 39°C), la monocapa se dispersó. La tripsina se inactivó agregando las células dispersadas en un recipiente de cultivo con medio de crecimiento. Las alícuotas congeladas del virus se descongelaron rápidamente o se resuspendieron en medio si la semilla se liofilizó. Las células TVL-BK (+20 o menos) se inocularon con virus. El virus que se estaba replicando en matraces o botellas de rodillos, que estaba destinado para el subcultivo, se recolectó después de que se observara el tiempo de incubación apropiado y/o el CPE. Los fluidos virales se almacenaron a una temperatura de 6 a -80°C o se usaron inmediatamente para inocular otros recipientes de cultivo.

Se usaron técnicas estándar de cultivo celular para inocular tanto los medios de producción como los de semilla. Se inocularon células TVL-BK en el pase 20 o menos. El inóculo del virus de producción congelado, que típicamente estaba en el MSV + 9, se descongeló rápidamente. El volumen de inóculo del virus varió de 1 a 25 ml por 1600 cm<sup>2</sup> de área de cultivo para lograr una multiplicidad de infección que oscila entre 0,01 y 1,0 virus por célula. El título mínimo de inóculo fue el siguiente: 10<sup>5.0</sup>TCID<sub>50</sub> por ml para BVDV-1b. Los cultivos inoculados se incubaron a 37 ± 2°C y 5 ± 1% de CO<sub>2</sub> durante 2 a 4 días.

#### Recolección

En el día de la recolección, se examinaron los cultivos para determinar el CPE específico del virus y la esterilidad. El tiempo mínimo de incubación típico fue 2 días después de la inoculación con BVDV-1b. El tiempo máximo de incubación típico fue de 4 días después de la inoculación con BVDV-1b. Las suspensiones de virus se recolectaron asépticamente de los recipientes de producción. Se recolectaron muestras para determinar el TCID<sub>50</sub> de la recolección. El material de recolección fue almacenado de 6 a -80°C. El material de recolección se puede almacenar por encima de la congelación hasta por un mes y congelado por hasta seis meses antes de la fabricación del producto final.

Se descartaron los fluidos de recolección que exhibían un CPE atípico o evidencia de contaminación. Solo los fluidos de recolección que presentaban CPE típico y libres de contaminación eran elegibles para un uso adicional en la producción. El título de virus de recolección mínimo aceptable fue 10<sup>6</sup> TCID<sub>50</sub>/ml. La pureza de los fluidos de recolección se confirmó de la siguiente manera: se añadió asépticamente una muestra de 2 ml de fluido de recolección a 38 ml de SCDB y se incubó a una temperatura de 35 a 39°C junto con controles negativos (medio solo) y positivos durante 46 a 50 horas. La ausencia de crecimiento macroscópico en los cultivos, así como el control negativo, establecieron que los fluidos de recolección eran puros y satisfactorios para un uso adicional en la producción. Se descartaron los fluidos de recolección que no se encontraron puros.

#### Formulación ejemplar de un virus vivo modificado, BVDV

Todas las manipulaciones se realizaron utilizando una técnica aséptica. Se agregaron antibióticos adecuados, como neomicina y nistatina (micostatina) durante el ensamblaje de una serie o subserie de vacuna a una tasa de 15 µg y 15 Unidades/dosis, respectivamente. Los fluidos de recolección se diluyeron en DMEM según fue necesario para ajustar la concentración, y se estabilizaron mediante la adición de una solución de sacarosa filtrada por 0,2 µm, lo que dio como resultado una concentración final de sacarosa de 20 ± 1%.

Los fluidos de recolección de virus se concentraron opcionalmente mediante ultrafiltración estéril usando un filtro de corte de peso molecular de 10 kDa. El grado de concentración típicamente no excedió 50 veces.

Se analizó cada lote de fluidos virales recogidos para determinar la TCID<sub>50</sub>. Brevemente, se utilizaron diluciones logarítmicas (10<sup>-1</sup> hasta 10<sup>-8</sup>) del material de recolección para inocular células TVL-BK en una placa de 96 pozos. Las placas se incubaron a 37 ± 2°C y 5 ± 1% de CO<sub>2</sub> durante 96 ± 6 horas. Después se leen las placas de incubación a 100 aumentos y se examinan para CPE. Los títulos se determinaron mediante el procedimiento de Spearman-Kärber, modificado por Finney (1978). Los recipientes finales, que habían sido esterilizados previamente, se llenaron de manera aséptica. Los recipientes finales se taparon parcialmente con un tapón de sello interno estéril.

Los viales del producto final se transfirieron a un liofilizador y se desecaron. El tiempo del ciclo de secado osciló entre 24 y 72 horas, con una temperatura máxima del producto de 22°C. El contenido de humedad del producto final desecado típicamente no superó el 5%, y la cantidad mínima de material antigénico por dosis en el recipiente final fue preferiblemente de aproximadamente  $8 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> por dosis.

5

**Ejemplo 2 - Estudio de la exposición de terneros a la vacuna monovalente BVDV-1B**

El presente ejemplo demuestra la eficacia de una vacuna monovalente BVDV-1b para prevenir la infección en animales vacunados.

10

**Materiales y procedimientos**

**Animales**

15

Se adquirieron terneros sanos de raza mixta de cuatro a cinco meses de edad de una fuente comercial, se identificaron mediante etiquetas de orejas al azar y se examinaron serológicamente para determinar su susceptibilidad al BVDV. Todos los terneros recibieron una dosis de ácido libre de cristales de Ceftiofur (Excede®, Pfizer Animal Health, Nueva York, NY, EE.UU.) a su llegada. Los terneros tenían acceso libre al agua, al heno y a una ración de alimento granulada.

20

**Vacuna**

25

La vacuna BVDV-1b, virus vivo modificado, se preparó como se describió anteriormente. Brevemente, el virus de la semilla maestra BVDV-1b se propagó en la línea celular TVL-BK (vigésimo pase), se recogió en el pase 10, se estabilizó de acuerdo con el esquema de producción, se llenó en botellas y se liofilizó. La concentración de BVDV era de  $8 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> por dosis según lo determinado por el procedimiento de Spearman-Kärber (véase, por ejemplo, Finney, 1978). Se usó agua estéril como diluyente para rehidratar la vacuna.

30

**Vacunación y exposición de los terneros**

Se mezclaron diecinueve (19) terneros negativos para BVDV en un callejón de clasificación. Cada ternero se colocó en uno de dos grupos (vacunados o controles no vacunados) mediante el uso de un esquema de distribución aleatoria de grupos emparejados (Tabla 1) proporcionado por CVB-Biometrics (Ames, IA, EE.UU.).

35

**Tabla 1. Tabla de distribución aleatoria de coincidencia por pares**

Sujeto de prueba	Grupo	Ternero
1	A	53
2	B	12
3	A	54
4	B	2
5	A	50
6	A	74
7	B	32
8	A	77
9	B	3
10	A	67
11	B	22
12	A	72
13	B	71
14	B	1
15	A	69
16	B	58

(continuación)

Sujeto de prueba	Grupo	Ternero
17	A	39
18	A	65
19	B	68

Grupo A = Vacunados; Grupo B= Controles no vacunados

5 Se vacunaron diez de los terneros serológicamente negativos con una dosis de vacuna BVDV-1b. A cada vacunado se le administró una dosis de 2 ml del producto mediante inyección subcutánea en el lado izquierdo del cuello el Día 0. El resto de los terneros no recibió ninguna vacuna viral. Después de la vacunación, los dos grupos de terneros se mantuvieron en corrales separados pero equivalentes hasta dos días antes de la exposición.

10 Se recogieron muestras de sangre el día de llegada y se analizaron los títulos de BVDV. También se recogieron muestras de sangre el día de la vacunación y el día de la exposición. Los títulos de anticuerpos de BVDV-1b se determinaron mediante el procedimiento de neutralización del suero que disminuye constantemente el virus (Scheffers et al., 2008). Dos días antes de la exposición, los grupos de control vacunados y no vacunados se mezclaron con el propósito de la observación clínica previa a la exposición. Catorce (14) días después de la vacunación, los terneros vacunados y de control se expusieron a un aislado virulento de BVDV-1b obtenido de los pulmones de un ternero muerto. El virus se había pasado in vitro en células TVL-BK utilizando DMEM que contenía 15 10% de suero equino. Se administró una dosis de prueba de  $8 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> en 4 ml a cada ternero, 2 ml en cada pasa nasal durante la inspiración.

20 Las temperaturas rectales se registraron diariamente para cada ternero durante dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

25 Los recuentos de glóbulos blancos (WBC) se determinaron para cada ternero durante dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición. Las muestras se recolectaron en tubos Vacutainer® con EDTA y los recuentos se realizaron utilizando un contador diferencial de glóbulos blancos Hemavet 950<sup>MR</sup> de Drew Scientific (Waterbury, CT, EE.UU.).

30 Se recogieron frotis nasales y capas leucocitarias de cada ternero dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición a los efectos del aislamiento del BVDV. Los frotis nasales se recolectaron utilizando frotis de cultivo BBL con medio Stuart líquido (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EE.UU.). El medio de las muestras se filtró de forma estéril y se usó para inocular células TVL-BK 80% confluentes en cultivo.

35 Se recogieron las capas leucocitarias de los tubos Vacutainer con EDTA y se usaron para inocular de células TVL-BK 80% confluentes en cultivo. La capa leucocitaria se retiró después de incubar durante una hora. Los cultivos se incubaron durante 4 a 5 días en  $5 \pm 2\%$  de CO<sub>2</sub> a  $37 \pm 3^\circ\text{C}$ . Los sobrenadantes de todas las muestras de cultivo se analizaron para determinar la presencia de BVDV-1b mediante RT-PCR utilizando un grupo de cebadores específicos para BVDV-1b (BVDV-1b (primero)) desarrollado por los inventores con una sonda de detección adecuada:

40 **BVDV-1b (primero):**

Cebador directo: 5'-CACCTATCAGGCTGTATTCATAGC-3' (SEQ ID NO: 1);  
 Cebador inverso: 5'-TGCCACAGCACATCTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2); y  
 Sonda de detección de BVDV-1b: 5'-TCACCTGGACGACCC-3' (SEQ ID NO: 3).

45 **BVDV-1b (segundo):**

Segundo cebador directo: 5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 19);  
 Segundo cebador inverso: 5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 20); y  
 Segunda sonda de detección de BVDV-1b: 5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 21).

50 Aunque BVDV-1b (primero) proporciona resultados aceptables, BVDV-1b (segundo) muestra mejores resultados.

55 Todas las observaciones clínicas se realizaron de forma independiente, y los observadores actuaron en forma ciega debido a que tanto los grupos de control vacunados como no vacunados se mezclaron con la única característica diferenciadora que es el número de etiqueta de oreja. En ningún momento a lo largo del estudio, los observadores tuvieron conocimiento del estado de vacunación de un animal de prueba individual hasta que se concluyeron las evaluaciones clínicas.

### Análisis estadístico

**Leucopenia:** se calculó una media de leucocitos antes de la exposición para cada animal al promediar los recuentos de leucocitos de los días -2 a 0. Se calculó la relación de los recuentos diarios de leucocitos en relación con la media de la exposición previa (el recuento de leucocitos como una proporción de la exposición previa) para cada exposición posterior del 1 al 14. Se analizaron estos datos de proporción para determinar si los animales individuales desarrollaron una leucopenia como se define por una disminución del 25% en los recuentos desde el inicio. La fracción prevenible se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993) para determinar si la vacunación previno el desarrollo de leucopenia en este estudio.

**Secreción nasal:** los datos de aislamiento del virus del análisis de hisopo nasal se basan en la proporción de vacunados de los cuales se aisló el BVDV en comparación con la proporción de controles en los que se aisló el BVDV después de la exposición. La fracción prevenible para la eliminación de BVDV-1b se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993).

**Viremia:** se analizaron los datos de aislamiento del virus de las capas leucocitarias de muestras de sangre en función de la proporción de vacunados de los cuales se aisló BVDV-1b en comparación con la proporción de controles que se aislaron de BVDV-1b después de la exposición. La fracción prevenible se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993).

**Títulos de anticuerpos:** las comparaciones de grupo de los títulos a escala ordinaria se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney.

**Temperatura rectal:** Se determinó una temperatura rectal promedio antes de la exposición para cada animal. Este promedio se usó como covariable en un análisis de varianza (ANOVA) de medidas repetidas que incluyó términos para las interacciones de Grupo, Día y Grupo\*Día. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS Learning Edition v2.0 para Microsoft Windows® (SAS Institute, Inc., Cary, NC, EE.UU.).

### Resultados

Se detectó leucopenia en uno de los diez vacunados y en ocho de los nueve controles, lo que dio como resultado una fracción prevenible del 87%. Los datos de leucocitos en bruto se registran en la Tabla 2.

**Tabla 2. Conteo de Leucocitos Vacunados**

Vacunados	Día -2	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
39	10,62	9,24	8,56	6,42	7,60	8,66	8,48	9,58	8,20
50	6,30	5,94	5,00	4,68	6,58	5,78	6,22	9,40	8,04
53	7,66	7,10	6,90	7,14	7,00	8,10	8,14	8,62	8,18
54	4,62	4,00	4,38	4,98	5,14	5,96	5,54	6,52	7,08
65	6,08	4,56	5,26	4,90	5,06	4,52	4,14	5,68	6,04
67	8,40	9,08	8,62	7,80	9,10	8,40	8,68	9,06	9,96
69	7,20	6,76	6,78	7,22	7,94	7,52	7,42	7,20	6,76
72	7,22	6,98	6,52	5,94	5,94	5,94	6,22	7,10	5,86
74	8,02	7,32	7,46	7,96	11,00	8,10	8,26	7,08	7,26
77	7,22	5,90	5,10	4,72	4,76	4,86	6,22	6,12	7,02

**Tabla 2 (continuación) Vacunados**

Vacunados	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14
39	8,30	10,62	6,72	10,76	15,38	11,42	9,38	11,62
50	8,88	6,30	6,54	6,44	6,22	5,92	7,24	6,04
53	9,06	7,66	8,74	10,06	11,14	9,66	10,70	10,58
54	6,94	4,62	5,40	5,72	7,62	8,46	8,02	9,26
65	5,00	6,08	4,78	5,30	6,08	9,80	8,14	7,28
67	8,56	8,40	9,60	9,60	9,54	11,24	11,38	9,38
69	6,40	7,20	7,10	8,98	9,96	12,74	11,54	10,14
72	6,08	7,22	5,64	7,24	7,22	7,76	7,12	12,94
74	6,16	8,02	8,06	7,44	8,46	9,62	9,78	9,96
77	6,44	7,22	5,94	6,00	7,92	8,04	9,78	8,42



## ES 2 709 190 T3

Tabla 2 (continuación)  
Controles

Controles	Día -2	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
1	11,62	10,90	11,78	12,28	11,14	7,66	8,70	7,76	9,40
2	10,40	9,68	9,68	10,60	10,22	8,12	8,84	7,70	7,96
3	8,10	7,68	8,28	9,82	7,80	10,26	5,90	5,02	5,52
12	6,76	7,08	6,98	7,78	8,42	7,52	5,60	4,64	4,98
22	10,22	8,82	8,16	9,84	9,42	6,28	5,40	5,28	5,48
32	10,40	11,32	9,54	8,72	8,84	7,82	5,96	5,68	7,18
58	6,40	6,00	6,52	6,64	7,22	5,24	2,58	2,56	3,70
68	8,72	8,30	7,06	8,52	8,28	6,18	5,38	4,08	3,93
71	5,94	6,28	6,90	6,22	7,92	5,90	8,06	6,08	6,54

Tabla 2 (continuación)  
Controles

Controles	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14
1	8,60	11,62	9,00	8,70	7,66	4,64	6,54	5,92
2	9,12	10,40	11,96	10,10	9,50	9,56	9,20	9,86
3	6,94	8,10	10,62	3,68	3,64	4,58	4,02	5,00
12	4,00	6,76	4,56	5,80	6,42	7,22	8,04	7,96
22	5,82	10,22	9,42	7,10	7,44	7,94	8,36	8,58
32	8,04	10,40	8,12	16,52	6,28	7,20	8,38	8,94
58	4,60	6,40	5,08	9,60	4,48	7,30	6,74	6,08
68	5,10	8,72	5,00	7,18	5,08	5,90	5,80	5,48
71	9,94	5,94	9,20	6,80	7,18	6,56	7,00	6,68

5 La proporción diaria del promedio previo a la exposición para cada ternero se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Conteo de Leucocitos - Porcentaje del promedio de exposición previa  
Vacunados

Vacunados	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
39	-0,322	-0,198	-0,086	-0,105	0,011	-0,134	-0,124	0,121
50	-0,186	0,145	0,006	0,082	0,636	0,399	0,545	0,096
53	-0,011	-0,030	0,122	0,127	0,194	0,133	0,255	0,061
54	0,149	0,186	0,375	0,278	0,505	0,634	0,602	0,066
65	-0,075	-0,045	-0,147	-0,219	0,072	0,140	-0,057	0,147
67	-0,103	0,046	-0,034	-0,002	0,041	0,145	-0,016	-0,034
69	0,044	0,149	0,088	0,073	0,041	-0,022	-0,074	0,041
72	-0,140	-0,140	-0,140	-0,099	0,028	-0,152	-0,120	0,045
74	0,047	0,447	0,066	0,087	-0,068	-0,045	-0,189	0,055
77	-0,223	-0,216	-0,200	0,024	0,008	0,156	0,060	0,189

10

Tabla 3 (continuación)  
Vacunados

Vacunados	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Leucopenia
39	-0,291	0,136	0,624	0,205	-0,010	0,227	+
50	0,138	0,121	0,082	0,030	0,260	0,051	-
53	0,211	0,393	0,543	0,338	0,482	0,465	-
54	0,246	0,320	0,758	0,952	0,851	1,137	-
65	-0,098	0,000	0,147	0,849	0,536	0,374	-
67	0,103	0,103	0,097	0,292	0,308	0,078	-
69	0,027	0,299	0,441	0,843	0,669	0,467	-
72	-0,183	0,048	0,045	0,124	0,031	0,874	-
74	0,061	-0,021	0,113	0,266	0,287	0,311	-
77	-0,022	-0,012	0,304	0,324	0,610	0,386	-

Tabla 3 (continuación)  
Controles

Controles	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
1	0,074	-0,026	-0,330	-0,239	-0,321	-0,178	-0,248	0,016
2	0,069	0,030	-0,181	-0,109	-0,224	-0,198	-0,081	0,048
3	0,224	-0,027	0,279	-0,264	-0,374	-0,312	-0,135	0,010

15

(continuación)

Controles	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
12	0,121	0,213	0,084	-0,193	-0,331	-0,282	-0,424	-0,026
22	0,085	0,039	-0,307	-0,404	-0,418	-0,396	-0,358	0,127
32	-0,163	-0,152	-0,250	-0,428	-0,455	-0,311	-0,228	-0,002
58	0,053	0,145	-0,169	-0,591	-0,594	-0,413	-0,271	0,015
68	0,061	0,032	-0,230	-0,330	-0,492	-0,512	-0,365	0,086
71	-0,024	0,243	-0,074	0,265	-0,046	0,026	0,560	-0,068

**Tabla 3 (continuación)**

**Controles**

Controles	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Leucopenia
1	-0,213	-0,239	-0,330	-0,594	-0,428	-0,482	+
2	0,206	0,018	-0,042	-0,036	-0,073	-0,006	-
3	0,324	-0,541	-0,546	-0,429	-0,499	-0,377	+
12	-0,343	-0,164	-0,075	0,040	0,159	0,147	+
22	0,039	-0,217	-0,179	-0,124	-0,078	-0,054	+
32	0,221	0,585	-0,397	-0,309	-0,196	-0,142	+
58	-0,195	0,522	-0,290	0,158	0,069	-0,036	+
68	-0,377	-0,105	-0,367	-0,265	-0,277	-0,317	+
71	0,444	0,067	0,127	0,029	0,098	0,048	-

5 Se aisló BVDV-1b a partir de secreciones nasales de uno de diez vacunados y ocho de nueve controles, dando como resultado una fracción prevenible de 90%. Estos datos se muestran en la Tabla 4.

**Tabla 4. Aislamiento de BVDV-1b de frotis nasales**

**Vacunados**

Vacunados	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 4. (Continuación)**

**Vacunados**

Vacunas	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Sumario
39	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-
67	-	+	-	-	-	-	+
69	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-
77	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 4 (continuación)**

**Controles**

Controles	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
1	-	-	-	-	-	-	+	-	+
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	+	-	+	-	-
12	-	-	-	-	-	+	+	-	+
22	-	-	-	-	-	-	-	-	+
32	-	-	-	-	+	-	+	-	+

15

(continuación)

Controles	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
58	-	-	-	-	-	-	+	-	+
68	-	-	-	-	-	-	-	-	+
71	-	-	-	-	+	-	-	-	+

**Tabla 4 (Continuación)  
Controles**

Controles	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Sumario
1	-	-	-	-	-	-	+
2	-	-	+	-	-	-	+
3	-	+	+	+	+	+	+
12	+	-	-	-	+	-	+
22	+	-	-	-	+	-	+
32	-	-	+	-	+	-	+
58	+	+	+	+	+	-	+
68	+	+	+	+	+	-	+
71	-	+	-	-	-	-	+

5 + Denota un resultado positivo; - denota un resultado negativo

Se aisló BVDV-1b a partir de capas leucocitarias de dos terneros vacunados y todos los nueve terneros de control resultaron en una fracción prevenible del 80%. Estos datos se muestran en la Tabla 5.

10 **Tabla 5. Aislamiento de BVDV-1b de capas leucocitarias  
Vacunados**

Vacunados	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	-	-	-
69	-	-	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	-	-	+
77	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabla 5. (continuación)  
Vacunados**

Vacunados	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Sumario
39	-	-	-	-	-	-	-
50	-	-	-	-	-	-	-
53	-	-	-	-	-	-	-
54	-	-	-	-	-	-	-
65	-	-	-	-	-	-	-
67	-	-	-	-	-	-	+
69	-	-	-	-	-	-	-
72	-	-	-	-	-	-	-
74	-	-	-	-	-	-	+
77	-	-	-	-	-	-	-

15 **Tabla 5. (continuación)  
Controles**

Controles	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7	Día 8
1	-	-	-	+	-	+	+	+	-
2	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3	-	-	-	-	+	+	+	+	-
12	-	-	-	-	-	+	+	+	+
22	-	-	-	-	+	+	+	+	+
32	-	-	-	-	+	+	+	-	+
58	-	-	-	-	+	+	+	+	+
68	-	-	-	-	-	+	+	+	+
71	-	-	-	-	+	+	+	+	+

Tabla 5. (continuación)  
Controles

Controles	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14	Sumario
1	+	-	-	-	-	-	+
2	+	+	-	-	-	-	+
3	+	+	-	-	-	-	+
12	+	+	+	-	-	-	+
22	-	+	-	-	-	-	+
32	-	+	-	-	-	-	+
58	+	+	-	-	-	-	+
68	+	+	+	-	-	-	+
71	-	+	-	-	-	-	+

5 La vacunación indujo un aumento estadísticamente significativo ( $P < 0,05$ ) en los títulos de anticuerpos SN de BVDV-1b. La vacuna no causó un aumento significativo en los títulos SN de BVDV-1a o BVDV-2. Los títulos de anticuerpos SN individuales se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6. Título de anticuerpos neutralizantes en suero

Tipos	1a	1a	1b	1b	2	2
Vacunados	Vac prev	Exp prev	Vac prev	Exp prev	Vac prev	Exp prev
39	<2	<2	<2	16	<2	<2
50	<2	<2	<2	16	<2	<2
53	<2	<2	<2	<2	<2	8
54	<2	<2	<2	8	<2	<2
65	<2	<2	<2	<2	4	2
67	<2	<2	<2	16	4	<2
69	<2	<2	<2	64	<2	<2
72	<2	<2	<2	128	<2	2
74	<2	8	<2	256	<2	<2

10

Tabla 6 (continuación)

Tipos	1a	1a	1b	1b	2	2
Controles	Vac prev	Exp prev	Vac prev	Exp prev	Vac prev	Exp prev
1	<2	<2	<2	<2	<2	<2
2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
3	<2	<2	<2	<2	<2	<2
12	<2	<2	<2	<2	<2	<2
22	<2	<2	<2	<2	<2	<2
32	<2	<2	<2	<2	<2	<2
58	<2	<2	<2	<2	<2	<2
68	<2	<2	<2	<2	<2	<2
71	<2	<2	<2	<2	<2	<2

15 El análisis de los datos de temperatura rectal no reveló ningún efecto estadísticamente significativo de la vacunación. Los datos de temperatura rectal se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Temperaturas rectales  
Vacunados

Vacunados	Día -2	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
39	103,1	100,8	102,0	99,5	100,4	100,7	101,2	101,7	102,2
50	102,5	101,3	101,6	99,6	100,6	100,6	101,5	101,0	102,6
53	103,1	101,2	102,1	99,4	101,4	101,0	101,8	100,4	102,3
54	102,1	101,7	102,1	100,3	101,4	101,4	101,2	101,5	101,0
65	102,7	102,8	104,3	101,1	100,9	102,4	101,5	101,4	101,4
67	101,8	101,3	102,0	101,4	100,5	101,3	101,1	101,2	101,5
69	101,2	100,6	101,1	99,3	100,9	101,8	101,5	101,6	101,6
72	102,6	102,4	102,3	101,3	101,4	100,4	101,9	102,0	102,0
74	103,4	102,2	102,5	100,4	101,6	101,2	101,8	103,5	103,5
77	101,5	101,1	101,7	100,2	100,4	101,4	101,6	102,0	102,0

20

Tabla 7 (continuación)  
Vacunados

Vacunados	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14
39	101,3	101,3	101,1	101,0	102,1	101,0	101,7	101,1
50	102,4	102,0	102,0	101,3	102,0	102,5	101,2	101,2
53	101,4	101,2	101,2	100,2	101,3	101,7	101,3	100,9
54	102,0	101,0	101,0	101,0	101,2	101,2	101,0	100,4
65	102,8	101,7	101,7	101,4	101,7	103,7	102,5	101,4
67	101,6	101,9	101,9	100,5	101,2	101,2	101,0	101,3
69	101,3	101,3	101,3	99,8	101,1	101,1	101,4	99,7
72	102,4	102,0	102,0	102,0	102,7	101,3	102,2	102,2
74	103,0	100,8	100,8	100,3	101,0	100,4	101,0	100,1
77	102,0	101,0	101,0	100,5	100,4	101,2	101,8	101,0

Tabla 7. (Continuación)  
Controles

Controles	Día -2	Día -1	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
1	101,3	101,0	101,5	100,7	100,3	101,9	101,6	101,4	100,2
2	101,0	100,7	102,0	100,2	101,0	101,1	101,9	103,8	101,3
3	101,4	101,5	101,4	101,1	101,0	101,4	101,6	101,8	101,7
12	100,4	100,1	101,4	98,6	100,9	101,0	100,8	100,0	103,2
22	101,9	99,9	100,9	99,2	100,2	99,5	100,3	100,5	101,2
32	102,1	102,0	101,3	100,2	99,5	100,4	100,1	100,2	100,7
58	102,4	101,5	101,9	99,4	101,0	100,7	102,2	101,3	102,6
68	102,1	100,3	102,2	100,4	101,2	101,4	100,5	101,3	101,4
71	101,3	100,2	101,3	100,2	101,2	101,3	101,1	101,2	101,5

5

Tabla 7 (continuación)  
Controles

Controles	Día 7	Día 8	Día 9	Día 10	Día 11	Día 12	Día 13	Día 14
1	102,2	103,3	100,7	101,2	101,3	100,6	101,5	101,2
2	100,4	102,1	102,2	100,2	100,5	101,5	100,9	100,2
3	101,4	103,9	102,2	102,5	101,2	101,6	101,6	100,3
12	101,7	103,0	100,6	100,2	100,6	100,6	100,3	99,2
22	100,7	103,2	101,0	100,5	100,8	100,6	100,5	99,8
32	102,3	100,7	99,7	99,5	100,5	101,6	99,3	100,2
58	101,5	101,3	101,9	102,4	101,2	101,9	99,5	99,5
68	101,8	101,0	100,7	100,9	101,0	101,4	101,6	101,8
71	101,0	102,8	100,5	100,8	100,7	101,4	99,3	99,4

No hubo signos clínicos de infección por BVDV observados en ninguno de los terneros durante el curso de este estudio.

10

La vacunación de terneros de raza mixta sanos de cuatro a cinco meses de edad con una dosis de vacuna BVBV-1b (virus vivo modificado) produjo una estimación ajustada de la eficacia de la vacuna del 87% contra la leucopenia, del 90% contra secreción nasal de BVDV-1b y 80% contra la viremia. El análisis serológico también reveló una respuesta antigénica en los terneros vacunados.

15

### Ejemplo 3 - Evaluación del nuevo pase viral de BVDV-1B

Los presentes ejemplos evalúan la estabilidad del MSV TVL-BVDV-1b, asegurándose de que no volviera a la virulencia cuando se administró a los animales.

20

Una ampolla del virus se descongela y se usa para inocular células TVL-BK para producir TVL-BVDV-1b +1 ( $5 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub>/ml). Este virus se usa para inocular por vía intranasal el primer grupo de diez terneros con privación de calostro a una tasa de  $1 \times 10^6$  TCID<sub>50</sub> por ternero.

25

Los terneros de los grupos 2 a 5 se inoculan intranasalmente con las secreciones nasales agrupadas del grupo anterior de terneros.

30

El grupo uno consta de diez terneros, con el número de terneros en grupos de dos a cinco que van de dos a cinco terneros, dependiendo del número de terneros que eliminan el virus del primer grupo de 10 terneros. Cada ternero permanece en un corral aislado, y los resultados primarios del estudio son la falta de signos clínicos de VDV en los terneros y la estabilidad genética de la MS a través de al menos cinco pases sucesivos *in vivo*.

Las unidades experimentales se excluyen del estudio si tienen un título de BVDV-1a, BVDV-1b o BVDV-2 de  $\geq 2$  en el momento de la selección, según lo determina el procedimiento de neutralización del suero que disminuye

constantemente el virus.

Las muestras de sangre para serología se recogen de terneros durante el proceso de selección, el día de la inoculación (Día 0) y al final del estudio. Las secreciones nasales se recolectan de cada ternero individual en el grupo uno en los días dos a ocho después de la inoculación.

Las partes alícuotas de las secreciones nasales de cada ternero individual para cada uno de estos días se analizan para el aislamiento del virus y se almacenan congeladas. Se determina el día con el mayor número de terneros individuales que secretan BVDV-1b (es decir, el día de máxima secreción) y todas las muestras de secreción nasal de ese día se agrupan y se usan para inocular a los terneros en el grupo dos. Las secreciones nasales se recolectan de los terneros en grupos subsiguientes en este día predeterminado de secreción máxima. Estas muestras luego se analizan para determinar el aislamiento del virus y se almacenan congeladas hasta que se confirma la presencia del virus y se combinan las muestras y se usan para inocular el siguiente grupo de terneros o no se aísla ningún otro virus.

Los terneros se identifican por el número de etiqueta de oreja y se colocan en el sustituto de la leche durante seis a ocho semanas utilizando las prácticas generales de manejo y cuidado para la raza.

Las variables del resultado incluyen signos clínicos de BVDV, eliminación del virus a partir de muestras nasales y estabilidad genética del virus a través de cinco pases sucesivos *in vivo*. En todos los terneros se observan signos clínicos de infección por BVDV, y el último grupo de nuevo pase se observa durante 21 días después de la administración del virus recuperado. Todos los signos clínicos se registran y se determina la etiología de la enfermedad clínica.

Las muestras de secreción nasal se toman de terneros; alícuotas individuales de cada muestra se mantienen para el aislamiento y análisis de virus. Las muestras se procesan por filtración estéril a través de un filtro de 0,2 µm. Cada pozo de una placa de 12 pozos que contiene TVL-MDBK (aproximadamente 80% de confluencia) se inocula con una muestra. Un pozo por placa permanece sin inocular y sirve como control negativo. Un pozo de la placa se inocula con una dilución de la MS y sirve como control positivo. Las placas se incuban a 3-7% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 35-39°C durante 5 a 7 días. Las muestras se subcultivan en una placa secundaria durante 5 a 7 días adicionales. Los medios de los pozos que exhiben la morfología citopática típica de BVDV-1b se procesan adicionalmente para determinar la identidad del agente infeccioso mediante un ensayo de PCR.

La estabilidad genética de la Semilla Maestra se analiza comparando el pase más alto de BVDV recuperado de un ternero con la Semilla Maestra. La falta de secreción de los diez terneros en el grupo del estudio, o el aislamiento del virus que no se ha convertido en virulencia (como lo demuestra la falta de signos clínicos definitivos de BVDV) es indicativo de un estudio exitoso de nuevo pase, y estabilidad genética de la MS.

#### Ejemplo 4 - Preparación de una vacuna de BRDC hexavalente (virus vivo modificado)

El presente Ejemplo divulga la preparación de una vacuna de BRDC multivalente (6 vías) que incorpora la MS de BVDV-1b descrita anteriormente.

#### Materiales y Procedimientos

##### Microorganismos utilizados

BHV-1: el aislado de Cooper (Colorado) de BHV se aisló en 1956 de pulmones de un bóvido que tenía una enfermedad del tracto respiratorio superior (York et al., 1957). Este Virus de Semilla Maestra fue identificado como **TVL-BHV (Cooper) P0, agosto 5,1997 DW-1-21-W**.

BVDV-1a: La cepa Singer de BVDV-1a se obtuvo de APHIS. Esta Semilla Maestra se identificó como **TVL-BVD (Singer) P0, diciembre de 1998 DW4-29**.

BVDV-1b: la cepa TGAC de BVDV-1b se obtuvo de APHIS. Esta Semilla Maestra se identificó como **TVL-BVDV 1b MS 04/27/2007 DW3-095**.

BVDV-2: la cepa 125 de BVDV-2 se obtuvo de APHIS. Esta Semilla Maestra se identificó como **TVL-BVDV 2 Cepa 125 P0 11/01/01 DW3-90**.

PI<sub>3</sub>: la cepa Reisinger SF4 de PI<sub>3</sub> se obtuvo de APHIS. Esta Semilla Maestra se identificó como **TVL-PI<sub>3</sub> Reisinger SF-4P0, 2 de abril de 2001 (SM-83)**.

BRSV: la cepa N375 de BRSV se obtuvo de APHIS. Esta Semilla Maestra fue identificada como **TVL-BRSV P0 julio 20 de 2001 DW3-87**.

**Protocolo**

5 Antes de la inoculación de células TVL-BK con virus de siembra de producción, las células se visualizaron microscópicamente para confirmar que las células presentaban la morfología descrita anteriormente. Antes de recolectar cada lote de virus de producción, se observó que las células TVL-BK confirmaban que estaban exhibiendo los efectos citopatológicos típicos (CPE) asociados con el virus.

10 La consistencia de la virulencia, potencia y antigenicidad del BHV-1, BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-2, PI<sub>3</sub> y BRSV utilizados en esta vacuna se fomentaron mediante el almacenamiento en estado liofilizado o congelado, y restricciones en el número de pases o subcultivos.

15 Virus de producción = MSV + 10 (eficacia del pase serial), pero puede ser cualquier pase entre 5 y 10. Patrón de células de producción = MCS + 20 (eficacia del pase serial), pero también puede ser cualquier pase por debajo de 20.

Los inóculos del virus de trabajo (MSV + 1 a MSV + 8) y el inóculo del virus de producción (que fue típicamente, pero no exclusivamente, en MSV + 9), se propagaron típicamente en células TVL-BK; siempre que el número de pases de las células TVL-BK para la propagación del virus no exceda de unos 20 pases de MCS.

20 El medio de crecimiento para las preparaciones celulares de trabajo y producción era DMEM que contenía 5-10% de suero equino. El MSV se preparó y almacenó como se describió anteriormente.

25 Los recipientes de cultivo se sembraron mediante la división de cultivos de propagación activa en una proporción que oscila entre 1:3 a 1:6 (cm<sup>2</sup>:cm<sup>2</sup>). Se liberaron TVL-BK en matraces o botellas rotativas (destinadas a subcultivo) de la superficie de cultivo mediante la eliminación aséptica del medio de crecimiento y la adición de una solución de tripsina-EDTA 1X como se describe en el Ejemplo 1. Después de la incubación durante aproximadamente 5 minutos a una temperatura de 35 a 39°C, se dispersó la monocapa. La tripsina se inactivó agregando las células dispersadas en un recipiente de cultivo con medio de crecimiento.

30 Las alícuotas congeladas del virus se descongelaron rápidamente o se suspendieron en medio si la semilla se liofiliza. Las células TVL-BK (+20 o menos) se inocularon con virus.

35 El virus que se replicaba en matraces o botellas de rodillos, que estaba destinado para el subcultivo, se recogió después de que se hubiera observado el tiempo de incubación apropiado y/o el CPE. Los fluidos virales podrían almacenarse de 6°C a -80°C o usarse inmediatamente para inocular otros recipientes de cultivo. Se utilizaron técnicas estándar de cultivo celular para inocular tanto la semilla como los medios de producción. Se inocularon células TVL-BK en el pase 20 o menos. El inóculo del virus de producción congelado, que típicamente estaba en el MSV + 9, se descongeló rápidamente. El volumen de inóculo del virus varió típicamente de 1 a 25 ml por 1600 cm<sup>2</sup> de área de cultivo para lograr una multiplicidad de infección que varía de 0,01 a 1 virus por célula.

40 Los títulos mínimos de inóculos fueron los siguientes: 10<sup>5.5</sup> TCID<sub>50</sub> por ml para BHV, 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub> por ml por BVDV-1a, 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub> por ml por BVDV-1b, 10<sup>5.0</sup> TCID<sub>50</sub> por ml por BVDV-2, 10<sup>6.0</sup> TCID<sub>50</sub> por ml para el virus de PI<sub>3</sub>, y 10<sup>4.5</sup> TCID<sub>50</sub> por ml para BRSV. Los cultivos inoculados se incubaron a 37 ± 2°C y 5 ± 1% de CO<sub>2</sub>. BHV y PI<sub>3</sub> se incubaron durante 2 a 4 días, BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV-2 durante 4 a 6 días, y BRSV durante 5 a 8 días.

**Recolección**

50 En el día de la recolección, se examinó el cultivo para determinar el CPE específico del virus y la esterilidad. El tiempo mínimo de incubación fue 2 días después de la inoculación con BHV o PI<sub>3</sub>, 4 días después de la inoculación con BVDV-1a, BVDV-1b o BVDV-2 y 5 días después de la inoculación con BRSV. El tiempo máximo de incubación fue de 4 días después de la inoculación con BHV o PI<sub>3</sub>, 6 días después de la inoculación con BVDV-1a, BVDV-1b o BVDV-2, y 8 días después de la inoculación con BRSV.

55 Las suspensiones de virus se recogieron asépticamente de los recipientes de producción. Se recolectaron muestras para determinar el TCID<sub>50</sub> de la recolección. El material de recolección se almacenó a una temperatura de 6°C a -80°C. El material de recolección se puede almacenar por encima de la congelación hasta por un mes y congelarse hasta por seis meses antes de la fabricación del producto final.

60 Todas las manipulaciones se realizaron utilizando técnicas asépticas estándar. Se agregaron neomicina y nistatina (Mycostatin®, Bristol-Myers Squibb, Nueva York, NY, EE.UU.) durante el ensamblaje de una vacuna serial o subserial a una tasa de 15 µg y 15 Unidades/dosis, respectivamente.

65 Los fluidos de recolección se diluyeron en DMEM y se estabilizaron mediante la adición de una solución de sacarosa filtrada por 0,2 µm, lo que resulta en una concentración final de sacarosa de 10 ± 1%. Los fluidos de recolección del virus se pueden concentrar mediante ultrafiltración estéril utilizando un filtro de corte de peso molecular de 10 kDa. El grado de concentración típicamente no excedió 50 veces.

Se analizaron lotes de fluidos virales recolectados para determinar la TCID<sub>50</sub> (por ejemplo, Procedimiento de Spearman-Karber).

## 5 Ejemplo 5 - Estudios de eficacia para la vacuna BRDC hexavalente (virus vivo modificado)

Los Ejemplos 5 a 10 demuestran la efectividad de la vacuna viva, modificada del BRDC hexavalente, en la prevención de la enfermedad causada por cada uno de los virus que contiene. En este primer ejemplo, se muestra que la vacuna es efectiva en la prevención de enfermedades causadas por BVDV-1b.

10

### Materiales

La vacuna hexavalente (virus vivo modificado) se preparó de acuerdo con el procedimiento de producción descrito anteriormente. En resumen, BHV-1 (cepa Cooper), BVDV-1a (cepa Singer), BVDV-1b (cepa TGAC), BVDV-2 (125), Pl<sub>3</sub> (Reisinger SF-4) y BRSV (N375) se propagaron en el línea celular TVL-BK (vigésimo pase). Las fracciones individuales se recolectaron en el pase 10 y se combinaron en el producto de seis vías.

15

Los placebos de eliminación se realizaron junto con cada uno de los seriales de eficacia. Por ejemplo, el placebo sin BVDV contenía los mismos lotes de recolección de BRSV, BHV y Pl<sub>3</sub> que el serial de eficacia correspondiente. El medio de cultivo se sustituyó por el componente de BVDV para mantener un volumen equivalente entre el serial de eficacia y el placebo sin BVDV.

20

Se construyeron placebos de eliminación similares para cada componente del MLV de la vacuna hexavalente.

### 25 Procedimientos Experimentales

Para cada estudio, se adquirieron, terneros para carne/leche comerciales de aproximadamente 3-4 meses de edad en forma aleatoria y se identificaron mediante etiquetas de oreja. Estos terneros fueron desparasitados y vacunados contra pasteurellosis, micoplasmosis y carbunco sintomático. Los terneros en los grupos vacunados y de control se mantuvieron en corrales separados, no adyacentes pero equivalentes hasta dos días antes de la exposición (Día -2), momento en el que se mezclaron en un solo corral.

30

Todos los terneros fueron expuestos en el Día 0 con un aislado virulento del virus de interés. Por ejemplo, se pasó *in vitro* el BVDV-1b virulento (obtenido de los pulmones de un ternero muerto en el corral en Poky Feeders [Scott City, KS, EE. UU.]) a células TVL-BK utilizando DMEM con un 10% de suero equino. Se administró una dosis para exposición de aproximadamente  $8 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> en 4 ml a cada ternero, 2 ml en cada pasaje nasal durante la inspiración. Los terneros tuvieron acceso libre al agua, al heno costero de las Bermudas y a una ración de alimento mixto que contenía un coccidiostático, pero no antibióticos.

35

### 40 Distribución aleatoria

Se usó un esquema de distribución aleatoria por parejas para asignar terneros en dos grupos de tratamiento (vacunado o control vacunado con placebo) usando una tabla de distribución aleatoria proporcionada por CVB-Biometrics (Véase Tabla 1). Se distribuyó aleatoriamente una secuencia de tres terneros que ingresaron al callejón. Los dos grupos de tratamiento en una proporción de 2:1. Las etiquetas de oreja, extraídas al azar de un cubo en el momento de la extracción de sangre inicial para la evaluación serológica, identifican a los terneros. Los dos grupos de terneros se mantuvieron en corrales separados pero equivalentes antes de la exposición. Los terneros se mezclaron en un corral, dos días antes de la exposición (día -2).

45

### 50 Prueba ciega

El personal no tenía conocimiento de la identidad de los controles o de los vacunados. Todo el personal de campo y de laboratorio, con excepción del encargado del registro, trabajo en forma ciega para el estudio.

### 55 Resultado

El resultado primario seleccionado fue leucopenia después de la exposición. La leucopenia se definió como una disminución del 25% con respecto a los recuentos basales de glóbulos blancos. Otros resultados que apoyaron la eficacia de la vacuna incluyeron secreción nasal, viremia, pirexia, producción de anticuerpos y signos clínicos de infección viral.

60

### Estimador

Los recuentos individuales de glóbulos blancos (WBC) se convirtieron en un porcentaje del promedio previo a la exposición y se midieron en una escala de intervalo continuo. Estos porcentajes de recuento de WBC convertidos se determinaron diariamente durante al menos 14 días después de la exposición y sirven como el criterio principal para

65



la evaluación. La detección de leucopenia sirvió como criterio principal para determinar la resistencia (no afectada) o la susceptibilidad (afectada) a la exposición.

5 El grupo afectado y no afectado se comparó para determinar si la vacunación previno la leucopenia después de exposición al virus. Los signos clínicos de la enfermedad respiratoria y la detección de virus de las muestras de las nasal/capa leucocitaria sirvieron como criterios secundarios para determinar la susceptibilidad a la exposición. La duración de la leucopenia y la duración de la secreción (número de días en que se detectó el virus en un ternero individual) se analizó para determinar si la vacunación tenía un efecto mitigante sobre estos parámetros. Todas las temperaturas rectales diarias individuales se analizaron utilizando la temperatura promedio previa a la exposición (línea base) como una covariable. Las unidades experimentales se excluyeron del estudio si tenían un título viral  $\geq 2$  al inicio del estudio.

#### **Estructuras y procedimientos de muestreo.**

15 Se recogieron muestras de sangre de terneros inmediatamente antes de la vacunación (día -28 a -21) con eficacia serial o el correspondiente placebo de eliminación. Las muestras de sangre también se recolectaron inmediatamente antes de la exposición (Día 0) y nuevamente 14 días después de la exposición (Día 14). Las muestras de sangre para los recuentos diferenciales de WBC y el aislamiento del virus se recolectaron desde el día -2 hasta al menos el Día 14. Las muestras se recolectaron en tubos Vacutainer® con EDTA (Becton-Dickinson and Co., Franklin Lakes, NJ, EE.UU.), y los conteos se realizaron utilizando un contador diferencial de WBC Hemavet 950 de Drew Scientific. Se tomaron frotis nasales para el aislamiento del virus desde el día -2 hasta al menos el Día 14.

#### **Observaciones y recopilación de datos**

25 Se recogieron muestras nasales y muestras de sangre y se observaron terneros en busca de signos clínicos de infección viral en los días 2 a 14. Las temperaturas rectales se determinaron para cada ternero desde el día -2 hasta el Día 14.

30 Los datos del recuento de WBC se analizaron para determinar las reducciones en el recuento posterior a la exposición. Se calculó una media previa a la exposición para cada animal promediando los recuentos de WBC.

35 Día -2 a Día 0. Se calculó la proporción de recuentos diarios de WBC en relación con la media previa a la exposición (recuento de WBC como proporción de la fase previa a la exposición) para cada día 1-14 después a la exposición o más a discreción de los observadores. Si la proporción disminuía en un 25%, el individuo se clasificaba como leucopénico. Los frotis nasales se tomaron de cada ternero el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición frotando ambas narinas con un BBL Culture Swab® con medio Stuart líquido. El día de la recolección, las muestras se procesaron por filtración estéril a través de un filtro de 0,2  $\mu\text{m}$ . Cada pozo de una placa de 12 pozos que contenía TVL-MDBK (aproximadamente 80% de confluencia) se inoculó luego con una muestra. Un pozo por placa permaneció sin inocular y sirvió como control negativo. Un pozo de la placa se inoculó con una dilución del virus expuesto y sirvió como control positivo.

45 Las placas se incubaron a 3-7% de  $\text{CO}_2$  a una temperatura de 35-39°C durante 2 a 4 días. Los medios de cada pozo se recolectaron y almacenaron a una temperatura de -18°C a -22°C. Los medios de todos los pozos se analizaron mediante RT-PCR (Ridpath y Bolin 1998) para determinar si un virus en particular estaba presente en el cultivo. Los individuos que fueron positivos al cultivo para el virus se clasificaron como "secretores".

50 Se usaron capas leucocitarias de muestras de sangre para inocular cada pozo de una placa de 12 pozos que contenía TVL-MDBK (aproximadamente 80% de confluencia). Un pozo por placa permaneció sin inocular y sirvió como control negativo. Un pozo de la placa se inoculó con una dilución del virus de exposición y sirvió como control positivo. Las placas se incubaron a 3-7% de  $\text{CO}_2$  a una temperatura de 35-39°C durante 2 a 4 días. Los medios de cada pozo se recolectaron y almacenaron a una temperatura de -18 a -22°C. Los medios de todos los pozos se analizaron por RT-PCR (Ridpath y Bolin, 1998) para determinar si el virus estaba presente en el cultivo. Los individuos que dieron positivo para un virus en particular se clasificaron como "virémicos".

55 Las temperaturas rectales diarias para cada animal se registraron entre el Día -2 y el Día 14 (2 días antes de la exposición, el día de la exposición y 14 días después de la exposición) del estudio.

60 Se calculó una media antes de la exposición para cada animal promediando los valores de temperatura desde el Día -2 hasta el Día 0. Las temperaturas diarias se analizaron utilizando el valor inicial como una covariable.

65 **Títulos de anticuerpos de BVDV-1b:** en el caso de la eficacia de BVDV-1b, los títulos de anticuerpos de neutralización de suero contra BVDV-1b se determinaron mediante el procedimiento en suero de disminución constante del virus para cada animal el día de la vacunación inicial (día -21), El día de la exposición (Día 0) y al final del estudio. Los títulos de anticuerpos se determinaron utilizando una modificación del esquema especial A-17, valoración del anticuerpo neutralizador de virus de la diarrea viral bovina tipo 1. El ensayo modificado usó un aislado de BVDV-1b citopático como el virus indicador en lugar de un aislado de BVDV-1a. Los animales que desarrollaron

un título de anticuerpos  $\geq 8$  se consideraron como sero-convertidos a BVDV-1b.

Se estimaron las diferencias en la duración de la leucopenia, la secreción y la viremia entre el grupo vacunado y el grupo de control (fracción mitigada). Las temperaturas rectales se analizaron utilizando la temperatura promedio antes de la exposición (línea base) como covariable. El intervalo de confianza seleccionado fue del 95%.

**Leucopenia:** el análisis de los datos de leucopenia se basó en la proporción de vacunados que fueron leucopénicos en comparación con la proporción de controles vacunados con placebo que fueron leucopénicos después de la exposición viral. Esto se evaluó determinando la fracción prevenible según lo descrito por Tanner y Morgan (1993).

**Secreción y viremia:** los análisis de los datos de secreción y viremia se basan en la proporción de vacunados que secretan el virus o son virémicos en comparación con la proporción de controles vacunados con placebo que se secretan o son virémicos después de la exposición viral. Estos se evaluaron determinando la fracción prevenible según lo descrito por Tanner y Morgan (1993).

La diferencia de la mediana en la duración de la leucopenia entre los dos grupos se estimó y la fracción mitigada se calculó de acuerdo con Fergen (2004). La diferencia de la mediana en la duración de la secreción y la diferencia de la mediana en la duración de la viremia entre los dos grupos se estiman y las fracciones mitigadas se calculan según Fergen (2004).

**Observaciones clínicas:** El análisis de las temperaturas rectales para los días 1-14 se realizó con un análisis de mediciones repetidas de la varianza (ANOVA) que incluye los términos para las interacciones de Grupo, Día y Grupo \*Día utilizando la línea base como covariable. Cuando las interacciones de Grupo\*Día fueron significativas ( $p < 0,5$ ), el grupo vacunado se comparó con el control mediante el simple efecto de Group para cada punto de tiempo. Estas simples comparaciones de efectos se obtuvieron a partir de las interacciones Grupo\*Día.

**Análisis estadístico:** las comparaciones de grupo de los títulos de anticuerpos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS Learning Edition v2.0 para MS-Windows® como se describió anteriormente.

#### Ejemplo 5A - Estudios de eficacia para la vacuna de BRDC hexavalente

Los resultados de este estudio demuestran que el virus vivo modificado de diarrea viral bovina tipo 1b (BVDV1b), la rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza<sub>3</sub>, Vacuna contra virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado, es antigénico y eficaz como auxiliar en la prevención de las enfermedades causadas por BVDV1b. Se administró una dosis de la vacuna a veintitún terneros sero-negativos con BVDV. Se vacunaron diez terneros de control sero-negativos con una dosis de una vacuna placebo comparable con el producto coincidente. Todos los terneros fueron expuestos intranasalmente con BVDV1b. La vacunación dio como resultado un aumento del título de anticuerpos de BVDV1b y previno o redujo la viremia inducida por BVDV1b, la secreción nasal, pirexia, signos clínicos de la enfermedad y leucopenia. En consecuencia, se ha establecido un mínimo de BVDV1b-TCID<sub>50</sub> de  $2 \times 10^3$  por dosis para la fracción de BVDV1b de esta vacuna. Esta vacuna contiene BHV-1, PI<sub>3</sub>, BRSV, dos subgenotipos de BVDV tipo 1 (1a y 1b) y BVDV tipo 2.

**Vacunación, exposición y recolección de muestras:** treinta un (31) terneros negativos para BVDV se mezclaron en un callejón de clasificación. Cada ternero se separó con una puerta, ya que se arrearon al azar, tres terneros a la vez, a través del callejón en uno de los dos grupos (Grupo A, vacunados o Grupo B, controles vacunados con placebo) mediante el uso de un esquema de distribución aleatoria de grupos pareados.

Se vacunaron 21 terneros con una dosis de rinotraqueitis bovina, Diarrea viral, Parainfluenza<sub>3</sub> - Vacuna sincitial respiratoria, virus vivo modificado. A cada vacunado se le administró una dosis de 2 ml del producto mediante inyección subcutánea en el lado izquierdo del cuello en el Día 0. Se vacunaron diez terneros con una vacuna placebo combinada con el producto (sin BVDV). Dos días antes de la exposición, tanto los grupos vacunados como los grupos de control se mezclaron con el propósito de realizar una observación clínica previa a la exposición y adquirir la temperatura corporal basal y las lecturas de WBC. Los terneros vacunados y de control se expusieron 21 días después de la vacunación con un aislado virulento de BVDV1b obtenido de los pulmones de un ternero muerto. El virus se había pasado in vitro en células TVL-BK utilizando Medio de Eagle modificado de Dulbecco con un 10% de sueros equinos. Se administró una dosis para exposición de  $4 \times 10^7$  TCID<sub>50</sub> en 4 ml a cada ternero, 2 ml en cada pasaje nasal durante la inspiración.

Se recogieron muestras de sangre para determinar los títulos de anticuerpos antes de la vacunación, el día de la exposición (21 días después de la vacunación) y 14 días después de la exposición. Los títulos de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina se determinaron mediante el procedimiento de neutralización del suero que disminuye constantemente el virus.

Los frotis nasales para el aislamiento del virus se recolectaron de los terneros frotando ambas narinas con un BBL Culture Swab® en medio líquido de Stuart el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la

exposición.

Las muestras de sangre para el aislamiento del virus de la capa leucocitaria se recogieron de cada ternero mediante punción venosa en un tubo Vacutainer con EDTA el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

Las temperaturas rectales se registraron diariamente para cada ternero durante dos días consecutivos antes de la exposición, el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

Se realizaron y registraron observaciones clínicas para cada ternero. Los observadores actuaron en forma ciega debido a que tanto los grupos vacunados como los grupos de control se mezclaron con la única característica diferenciadora que es el número de etiqueta de oreja. En ningún momento a lo largo del estudio, los observadores tuvieron conocimiento del estado de vacunación de un animal de prueba individual. El personal de laboratorio no tenía conocimiento del estado de vacunación de los terneros.

Las muestras de sangre para determinar los recuentos diferenciales de WBC se recolectaron durante dos días consecutivos antes de la exposición, el día de la exposición y 14 días consecutivos después de la exposición. Las muestras se recolectaron en tubos Vacutainer con EDTA y los recuentos se realizaron utilizando un contador diferencial de glóbulos blancos Hemavet 950 de Drew Scientific.

**Detección de BVDV:** Se utilizaron técnicas de PCR mejoradas en cultivo celular para detectar BVDV1b en muestras recogidas. Brevemente, las muestras nasales se procesaron mediante filtración estéril (0,2 µm) en células TVL-BK en cultivo. Las capas leucocitarias se colocaron directamente en células TVL-BK en cultivo durante 45-75 minutos antes de ser lavadas de las células. Los cultivos se incubaron durante 4 días a 37°C ± 2°C y 5 ± 1% de CO<sub>2</sub>. El sobrenadante de todas las muestras de cultivo se analizó individualmente para determinar la presencia/ausencia de BVDV1b utilizando la metodología de RT-qPCR convencional y el siguiente grupo de sondas/cebadores:

Cebador directo: CACCCTATCAGGCTGTATTCATAGC (SEQ ID NO: 1)

Cebador inverso: TGCCACAGCACATCTTAACC (SEQ ID NO: 2)

Sonda TaqMan MGB: TCACCTGGACGACCC (SEQ ID NO: 3)

Este procedimiento se desarrolló con base en la *diferenciación de los virus de la diarrea viral bovina (BVDV) de los tipos 1a, 1b y 2 por PCR* (Julia F. Ridpath y Steven R. Bolin, Molecular and Cellular probes, Journal of Virological Methods, 130 (2005) 145-148). Este procedimiento también se basa en el Protocolo de Prueba del Centro para Compuestos Biológicos Veterinarios y los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios - Genotipado del Virus de la Diarrea Viral Bovina, Número BPPR02010.01. Ambos procedimientos de diferenciación de genotipos y subgenotipos de BVDV explotan las diferencias genéticas que existen en la región 5' no traducida (UTR) del genoma. Este grupo de sonda/cebador se diseñó específicamente para amplificar una sección de la UTR 5' en la que la sonda altamente específica puede detectar una única secuencia de BVDV1b. La especificidad del grupo de sonda/cebador se confirmó internamente y no reaccionó de forma cruzada con BHV, P1<sub>3</sub>, BRSV, BVDV1a o BVDV2. Los ensayos de RT qPCR se realizaron utilizando ensayos basados en Taqman® en un Applied Biosystems 7500.

**Análisis estadístico:** títulos de anticuerpos: las comparaciones de grupo de los títulos escalados de forma ordinaria se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney.

**Viremia:** se analizaron los datos de aislamiento del virus de las capas leucocitarias de muestras de sangre en función de la proporción de vacunados de los cuales se aisló BVDV1b en comparación con la proporción de controles en los que se aisló BVDV1b después de la exposición. La fracción prevenible para la viremia por BVDV1b se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993).

**Secreción nasal:** los datos de aislamiento del virus del análisis de hisopo nasal se basan en la proporción de vacunados de los cuales se aisló BVDV1b en comparación con la proporción de controles en los que se aisló BVDV1b después de la exposición. La fracción prevenible para la secreción de BVDV1b se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993).

**Temperatura rectal:** se determinó una temperatura rectal promedio antes de la exposición para cada animal. Este promedio se usó como covariable en un análisis de mediciones repetidas de varianza (ANOVA) que incluyó términos para las interacciones de Grupo, Día y Grupo\*Día.

**Signos clínicos de la enfermedad:** los signos clínicos de la enfermedad se registraron diariamente por cada observador de forma independiente. Cualquier ternero que muestre signos durante al menos un día de observación después de la exposición se consideró "afectado". La fracción prevenible para los signos clínicos se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993).

**Leucopenia:** se calculó una media de leucocitos antes de la exposición para cada animal al promediar los recuentos de leucocitos de los días -2 a 0. Se calculó la relación de los recuentos diarios de leucocitos en relación con la media

previa a la exposición (el recuento de leucocitos como una proporción de exposición previa) para cada día 1-14 después de la exposición. Esta proporción de datos se analizó para determinar si los animales individuales desarrollaron una leucopenia como se define por una disminución del 40% en los recuentos desde el inicio. La fracción prevenible se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993) para determinar si la vacunación previno el desarrollo de leucopenia en este estudio.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS versión 16 para Windows.

## Resultados

**Títulos de anticuerpos de neutralización de suero:** Todos los terneros en este estudio tenían un título de anticuerpos de neutralización de suero BVDV (BVDV1a, BVDV1b y BVDV2) antes de la vacunación de <1:2. El día de la exposición (día 21), el grupo vacunado tenía un título de BVDV1b promedio de 1:83 que fue significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) que aquel del grupo de control <1:2. Los títulos de anticuerpos de BVDV1b aumentaron 14 días después de la exposición tanto en terneros de control como en vacunados, lo que indica que los terneros habían sido expuestos con BVDV1b.

**Aislamiento de BVDV1b de capas leucocitarias:** todos los diez terneros de control en este estudio fueron virémicos durante la fase posterior a la exposición de este estudio. Sin embargo, siete de los terneros de control fueron virémicos durante el período de tiempo crítico en el que se observa típicamente la viremia posterior a la exposición a BVDV. Tres terneros de control (1, 14, 30) fueron virémicos el día de la exposición. Estos mismos tres terneros junto con el ternero 26 fueron virémicos al día siguiente a la exposición. Esta observación, junto con los datos serológicos, el aislamiento con hisopo nasal y la temperatura rectal sugieren que estos terneros se infectaron de forma natural al final de la fase de vacunación del estudio, se volvieron virémicos y comenzaron a secretar temprano en la fase de exposición de este estudio. Uno de estos cuatro terneros (ternero 30) se volvió virémico y eliminó el virus durante el período típico de viremia/secreción posterior a la exposición. Ninguno de los 21 vacunados fue virémico durante el período posterior a la exposición. Se calculó una fracción prevenida utilizando una proporción de 3/10 controles protegidos naturalmente y 21/21 vacunados protegidos. Esto resulta en una fracción prevenible de 1.0.

**Aislamiento de BVDV1b a partir de frotis nasales:** los diez terneros de control en este estudio eliminaron el BVDV1b durante la fase posterior a la exposición de este estudio. Sin embargo, siete de los terneros de control secretaron durante el período de tiempo crítico en el que normalmente se observa secreción posterior a la exposición de BVDV. Dos terneros de control (26 y 30) secretaron el día de la exposición. Tres terneros de control (1, 14 y 30) secretaron el día siguiente a la exposición.

Esta observación, junto con los datos serológicos, aislamiento de la capa leucocitaria y temperatura rectal, sugiere que estos terneros se infectaron de forma natural al final de la fase de vacunación del estudio, se volvieron virémicos y comenzaron a secretar temprano en la fase de exposición de este estudio. Uno de estos cuatro terneros (ternero 30) se volvió virémico y eliminó el virus durante el período típico de viremia/secreción posterior a la exposición. Solo 1 de los 21 vacunados eliminó el BVDV1b durante el período posterior a la exposición. Se calculó una fracción prevenida utilizando una proporción de 3/10 controles protegidos naturalmente y 20/21 vacunados protegidos. Esto resulta en una fracción prevenible de 0.93.

**Temperaturas rectales:** el análisis de los datos indicó una interacción significativa Grupo\*Día ( $p = 0,034$ ). El análisis por día indicó que las temperaturas en el grupo de control fueron significativamente mayores ( $p < 0,05$ ) que aquellas del grupo vacunado en los días 1,4,7 y 8 después de la exposición. En el día 12, las temperaturas rectales del grupo de control disminuyeron y fueron significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que aquellas del grupo vacunado.

**Signos clínicos de BVDV1b:** Ocho de diez terneros (8/10 afectados) en el grupo de control demostraron signos clínicos que podrían contribuir a la infección por BVDV1b. Los signos clínicos incluyeron diarrea, cantidades copiosas de secreción nasal clara, respiración rápida y secreción ocular. Ninguno (0/21 afectado) de los terneros en el grupo de vacunados demostró alguno de estos signos clínicos durante la fase posterior a la exposición del estudio. Se calculó una fracción prevenida utilizando una proporción de 2/10 controles protegidos naturalmente y 21/21 vacunados protegidos. Esto resulta en una fracción prevenible de 1.0. No se observaron reacciones adversas posteriores a la vacunación en ninguno de los terneros.

**Leucopenia:** se detectó leucopenia en cuatro de los 21 vacunados y en cinco de los diez controles, lo que resultó en una fracción prevenible del 62%.

## Conclusiones

Lo anterior demuestra la antigenicidad y la eficacia de la fracción del BVDV1b de la rinotraqueitis bovina, Diarrea viral, Parainfluenza<sub>3</sub>, Vacuna contra el virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado como ayuda en la prevención de la enfermedad causada por BVDV1b.

La antigenicidad y la eficacia de la fracción del BVDV1b de este producto combinado se confirma por lo siguiente:

- 1) Un aumento significativo en los títulos de anticuerpos para BVDV1b en el grupo de vacunados en comparación con el grupo de control. Todos los terneros en el grupo vacunado desarrollaron títulos de BVDV1b  $\geq 1:8$  después de la administración de una dosis de 2 ml, que cumplen con los requisitos definidos en el título 9 del CFR 113.311 (c) (5).
- 2) Los estudios de aislamiento de virus revelaron que la administración de una dosis resultó en una disminución significativa de la viremia y la secreción nasal inducidas por BVDV1b posterior a la exposición.
- 3) Los terneros vacunados mostraron significativamente menos fiebre en comparación con los terneros de control y no mostraron signos clínicos de enfermedad.
- 4) La vacunación también disminuyó la probabilidad de desarrollar una leucopenia inducida por BVDV1b.

Este estudio se vio afectado marginalmente por el hecho de que al menos tres de los terneros en el grupo de control se infectaron con BVDV1b poco antes de la exposición. Debido al hecho de que todos los terneros de control, incluidos los que estaban infectados, todavía eran seronegativos en el momento de la exposición, se concluyó que la exposición natural se produjo al final de la fase de vacunación del estudio. No hubo evidencia clínica de exposición natural en el grupo vacunado, probablemente debido a que se mantuvieron separados del grupo de control hasta 2 días antes de la exposición. La exposición natural es una posibilidad inherente cuando se realizan estudios de exposición en un entorno típico del ternero para carne/leche. Según Tanner y Morgan, la estimación de la eficacia de la vacuna determinada por la fracción prevenible considera la relación entre la protección observada y la efectividad de la vacuna para varios niveles de inmunidad natural.

Los hallazgos del estudio son estadísticamente significativos y clínicamente relevantes, por lo que demuestran la eficacia de la fracción del BVDV1b contenida en la vacuna.

#### **Ejemplo 6 - Protocolo de eficacia de BRSV**

Este ejemplo demuestra que la fracción del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) de la vacuna de MLV hexavalente ayuda en la prevención de la enfermedad causada por BRSV.

#### **Materiales y procedimientos**

Se prepara un placebo sin BRSV y se usa junto con la eficacia serial de una manera análoga a la descrita en el Ejemplo 5 para BVDV-1b. Este placebo sin BRSV contiene los mismos lotes de recolección de BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-2, BHV y PI<sub>3</sub> que la eficacia serial, con medios de cultivo que sustituyen al componente BRSV para mantener un volumen equivalente entre la eficacia serial y el placebo sin BRSV. El diluyente estéril se usa para rehidratar tanto la vacuna MLV hexavalente como el placebo sin BRSV como se describe en este documento.

#### **Procedimientos experimentales**

Se utilizan terneros comerciales de carne/leche aproximadamente 3-4 meses a partir de una población relativamente homogénea que tiene aproximadamente el mismo origen, tipo, peso y edad. Los terneros son desparasitados y vacunados contra pasteurelisis, micoplasmosis y carbunco sintomático. En el protocolo se utilizan números iguales de terneros vacunados y de control; los dos grupos de terneros se mantienen en corrales separados, no adyacentes pero equivalentes antes de la exposición, y se mezclan en un corral, dos días antes de la exposición (día -2). Los terneros tienen acceso libre al agua, heno costero de las Bermudas y una ración de alimento mixto que contiene un coccidiostático, pero no antibióticos.

#### **Distribución aleatoria**

Se utiliza un esquema de distribución aleatoria pareado para asignar terneros a dos grupos de tratamiento (vacunado o de control vacunado con placebo) usando una tabla de distribución aleatoria CVB-Biometrics, en la cual una secuencia de tres terneros que ingresan al callejón se distribuyen aleatoriamente en los dos grupos de tratamiento en una relación de 2:1. Las etiquetas de oreja, extraídas al azar de un cubo en el momento de la extracción de sangre inicial para la evaluación serológica, identifican a los terneros.

#### **Prueba ciega**

Todo el personal actúa en forma ciega para el estudio (con la excepción del encargado del registro), y no tiene conocimiento de la identidad de los controles o vacunados.

#### **Resultado**

El resultado primario es la prevención de la secreción nasal del virus BRSV después de la exposición, que se determina por la presencia o ausencia de BRSV en muestras nasales recolectadas diariamente de las narinas de todos los terneros durante el protocolo. Otros resultados secundarios pueden incluir uno o más signos clínicos

disminuidos de infección por BRSV, reducción de la pirexia y/o reducción de la duración de la secreción en los terneros que secretan BRSV.

La secreción de BRSV por los grupos vacunados y de control se determina diariamente durante 14 días después de la exposición, con detección de BRSV que sirve como el criterio primario para determinar la resistencia (no afectada) o la susceptibilidad (afectada) a la exposición. Los grupos afectados y no afectados se comparan para determinar si la vacunación previno la secreción del BRSV después de una exposición al BRSV. Los signos clínicos de la enfermedad respiratoria sirven como un criterio secundario para determinar la susceptibilidad o la resistencia a la exposición. Se analiza la duración de la secreción (número de días en que se detectó BRSV en un ternero individual) para determinar si la vacunación tuvo un efecto atenuante en este parámetro. Todas las temperaturas rectales diarias individuales se analizan frente a la covariable de temperatura promedio previa a la exposición (línea base). Las unidades experimentales se excluyen si tienen un título SN de BRSV > 2 al inicio del estudio.

#### Estructuras y procedimiento de muestreo

Se recogen muestras de sangre de terneros inmediatamente antes de la vacunación (día -28 a día -21) con eficacia serial o placebo sin BRSV, y nuevamente inmediatamente antes de la exposición (Día 0) y nuevamente 14 días después de la exposición (Día 14).

#### Observaciones y recopilación de datos.

Los frotis nasales se toman de cada ternero el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición frotando ambas narinas con un BBL Culture Swab® con medio líquido de Stuart. Los medios de las muestras se analizan para determinar la presencia de BRSV mediante PCR en tiempo real utilizando un grupo de sonda/cebador específicamente para detectar BRSV.

Cebador directo: 5'-GCAATGCTGCAGGACTAGGTATAAT-3 '(SEQ ID NO: 4);  
 Cebador inverso: 5'-ACACTGTAATTGATGACCCATTCT-3 '(SEQ ID NO: 5); y  
 Sonda TaqMan® MGB para BRSV: 5'-AAGACTTGTATGATGCTGCCAA-3 '(SEQ ID NO: 6).

Los datos de duración se analizan para demostrar que la vacunación tuvo un efecto mitigador sobre la duración del tiempo en que se detectó BRSV en muestras nasales.

**Observaciones clínicas:** las temperaturas rectales diarias para cada animal se registran entre el Día -2 y el Día 14 (2 días antes de la exposición, el día de la exposición y 14 días después de la exposición), y se calcula una media antes de la exposición para cada animal promediando los valores de temperatura desde el Día -2 hasta el Día 0. Las temperaturas diarias se analizan luego utilizando la línea de base como covariable.

Los títulos de anticuerpos de neutralización de suero se determinan mediante el procedimiento de suero que disminuye constantemente el virus para cada animal el día de la vacunación, el Día 0 y el Día 14 del estudio (Scheffers et al., 2008).

Los signos clínicos de BRSV en terneros para carne han sido descritos previamente por Baker (1986). Los signos clínicos incluyen, entre otros, secreción nasal y lagrimal, aumento de la frecuencia respiratoria, temperatura rectal elevada, depresión leve, disminución de la ingesta de alimento, hipersalivación y disnea. Los signos clínicos de infección por BRSV son menos obvios en los modelos de exposición tradicionales porque el virus utilizado para la exposición se ha atenuado por la propagación *in vitro*, y el único parámetro importante para evaluar estos modelos es la secreción del virus (Wren, 2001). En consecuencia, los signos clínicos se registran dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante los catorce días posteriores a la exposición. La observación de los signos clínicos de BRSV se toma en cuenta durante el análisis de los datos, pero no se considera como un resultado primario porque estos signos pueden ser indicativos de muchas enfermedades respiratorias que se encuentran comúnmente en el ganado comercial.

La proporción de controles vacunados y vacunados con placebo que se clasifican como afectados o no afectados se estima (fracción prevenida), al igual que la diferencia en la duración de la secreción entre el grupo vacunado y el grupo de control (fracción mitigada).

La eficacia de la fracción de virus BRSV de la vacuna de MLV hexavalente se puede evaluar fácilmente determinando la fracción prevenible según lo descrito por Tanner y Morgan (1993). Este análisis se basa en la proporción de vacunados que son resistentes a la exposición al BRSV en comparación con la proporción de controles vacunados con placebo que son resistentes.

**Análisis estadísticos:** la diferencia media en la duración de la secreción entre los dos grupos puede estimarse y la fracción mitigada puede calcularse según el procedimiento de Fergen (2004). Las comparaciones de grupos de los títulos de anticuerpos pueden analizarse con la prueba U de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS Learning Edition 2.0 para Microsoft Windows® como se describió anteriormente.

**Ejemplo 6A - Estudio de eficacia de BRSV**

Los resultados de este estudio demuestran que la fracción del virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) vivo modificado de rinotraqueitis bovina, diarrea viral, Parainfluenza<sub>3</sub>, vacuna contra el virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado, es antigénica y eficaz como una ayuda en la prevención de la secreción del virus sincitial respiratorio bovino en terneros para carne/leche. Se administró una dosis de la vacuna a veintidós terneros seronegativos para BRSV. Se vacunaron once terneros de control sero negativo con una dosis de una vacuna placebo comparable con el producto. Todos los terneros fueron expuestos en forma intranasal con BRSV. La vacunación dio como resultado un aumento del título de anticuerpos de BRSV e impidió la secreción de BRSV después de la exposición. En consecuencia, se ha establecido un BRSV-TCID<sub>50</sub> mínimo de  $7 \times 10^2$  por dosis para la fracción del BRSV de esta vacuna.

**Materiales y procedimientos**

**Vacunación y exposición de los terneros:** Treinta y tres (33) terneros BRSV negativos se mezclaron en un callejón de clasificación. Cada ternero se separó con una puerta, ya que fueron arreados al azar, tres terneros a la vez, a través del callejón en uno de los dos grupos (Grupo A, vacunados o Grupo B, controles vacunados con placebo) mediante el uso de un esquema de distribución aleatoria de grupos pareados proporcionado por CVB Biometrics

Veintidós de los terneros serológicamente negativos fueron vacunados con una dosis de rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza<sub>3</sub>, vacuna sincitial respiratoria, vacuna contra el virus vivo modificado. A cada vacunado se le administró una dosis de 2 ml del producto mediante inyección subcutánea en el lado izquierdo del cuello en el Día 0. Se vacunó a once de los terneros con una vacuna placebo comparable con el producto (sin BRSV). Se recogieron frotis nasales, se sangraron los terneros y se examinaron serológicamente para confirmar la susceptibilidad al BRSV mediante un ensayo de neutralización del suero que disminuye constantemente el virus. Dos días antes de la exposición, los grupos de vacunación y control se mezclaron con el propósito de hacer una observación clínica previa a la exposición. Los terneros vacunados y de control se expusieron 32 días después de la vacunación con 4 ml (2 ml por narina) de TVL-BRSV, aislado de N375. El virus de exposición se tituló inmediatamente antes de la exposición (TCID<sub>50</sub> de  $10^{6.6}$ /ml) y de nuevo inmediatamente después de la exposición (TCID<sub>50</sub> de  $10^{6.2}$ /ml). El virus para la exposición se mantuvo refrigerado durante todo el proceso de exposición.

Se recogieron muestras de sangre el día de la vacunación, el día de la exposición y 14 días después de la exposición. Los títulos de anticuerpos del virus sincitial respiratorio bovino se determinaron mediante el procedimiento de neutralización del suero que disminuye constantemente el virus.

Se recogieron frotis nasales el día de la vacunación, el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

Las temperaturas rectales se registraron diariamente para cada ternero durante dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

Se realizaron observaciones clínicas. Los observadores actuaron de forma ciega debido a que los grupos de vacunación y control se mezclaron siendo la única característica diferenciadora el número de etiqueta de oreja. En ningún momento a lo largo del estudio, los observadores tuvieron conocimiento del estado de vacunación de un animal de prueba individual. El personal de laboratorio no tenía conocimiento del estado de vacunación de los terneros.

**Detección del BRSV:** se recogieron frotis nasales de terneros frotando ambas narinas con un BBL Culture Swab® en medio líquido de Stuart. La observación visual del CPE específico del BRSV junto con las técnicas de PCR mejoradas en cultivo celular se utilizaron para detectar el BRSV en las muestras recolectadas. Brevemente, las muestras se procesaron por filtración estéril (0,2 µm) en células TVL-BK en cultivo. Los cultivos se incubaron durante 5 días a  $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$  y  $5 \pm 1\%$  de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se observaron para CPE específico de BRSV y se registraron los resultados. El sobrenadante de todas las muestras de cultivo (tanto el CPE+ como -) se analizaron individualmente para determinar la presencia/ausencia de BRSV utilizando el grupo de sonda/cebador descrito por M. Boxus et al., (Real Time RT-PCR for the detection and quantitation of bovine respiratory syncytial virus, M. Boxus, C. Letellier, P. Kerkhofs, Journal of Virological Methods, 125 (2005) 125-130 ).

La especificidad del grupo sonda/cebador se confirmó internamente y no reaccionó de forma cruzada con BHV, PI<sub>3</sub>, BVDV1a, BVDV1b o BVDV2. Los ensayos de RT qPCR se realizaron utilizando ensayos basados en Taqman® en un Applied Biosystems 7500.

Todas las muestras que eran positivas para CPE específicas para BRSV también eran positivas para PCR. Hubo 10 muestras que fueron negativas para el CPE específico de BRSV y positivas para BRSV mediante el ensayo de PCR. Esto es coherente con los estudios internos que indican que los ensayos basados en PCR son más sensibles que

los ensayos basados en la observación del CPE específico del BRSV. Las muestras que fueron negativas para BRSV después del cultivo primario se subcultivaron y el sobrenadante de los fluidos subcultivados se analizó para determinar la presencia/ausencia de BRSV de acuerdo con el mismo procedimiento.

5 **Análisis estadístico:** la eficacia de la fracción del BRSV de esta vacuna se basó principalmente en la proporción de vacunados que secretaron BRSV en comparación con la proporción de controles que secretaron BRSV después de la exposición. La fracción prevenible se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993). Se evaluó el número de días posteriores a la exposición en que se aisló el BRSV de terneros individuales en el estudio. Los grupos se compararon para determinar si la frecuencia del aislamiento de BRSV (secreción) se redujo significativamente en el grupo de vacunados en comparación con el grupo de control después de la exposición al BRSV.

10 Las comparaciones de grupo de los datos de títulos escalados de manera ordinaria se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las temperaturas rectales se analizaron utilizando el promedio de temperatura antes de la exposición como covariable. El análisis de la temperatura posterior a la exposición para el día 1-14 se realizó con un análisis de varianza de mediciones repetidas (ANOVA). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS para Windows.

## Resultados

20 **Títulos de anticuerpos de neutralización de suero:** Todos los terneros en este estudio tuvieron un título de anticuerpos de neutralización de suero antes de la vacunación  $<1:2$ . Los títulos de anticuerpos de neutralización en suero después de la vacunación fueron significativamente mayores ( $p \leq 0,05$ ) en el grupo vacunado en comparación con los del grupo de control. Veintiuno de los 22 terneros vacunados mostraron un aumento en los títulos de BRSV después de la vacunación, mientras que, los once controles vacunados con placebo permanecieron negativos durante todo el período de vacunación antes de la exposición. El título promedio de anticuerpos del grupo vacunado fue de 8,5, mientras que el título promedio del grupo de control fue  $<2$ .

30 **Aislamiento de BRSV:** todos los once terneros de control en este estudio secretaron BRSV durante la fase posterior a la exposición de este estudio. Solo 3 de los 22 vacunados secretaron BRSV durante este tiempo. Esto resulta en una fracción prevenible de 0,8636. También hubo una diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) en la frecuencia de secreción. El grupo de control secreto BRSV durante un promedio de 6,00 días, mientras que los vacunados secretaron solo durante 0,227 días. Esta es una diferencia de 5,773 días.

35 **Temperaturas rectales:** el análisis de temperatura rectal posterior a la exposición utilizando la temperatura promedio antes de la exposición como covariable no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. No se realizó ningún análisis adicional de estos datos.

40 **Signos clínicos de BRSV:** se examinó a cada animal para detectar signos clínicos de enfermedad respiratoria durante dos días consecutivos antes de la exposición, el día de la exposición y durante catorce días consecutivos después de la exposición. No se observaron signos clínicos que pudieran atribuirse definitivamente a la infección por BRSV. Sin embargo, se registró una descarga nasal excesiva clara como un signo clínico para 7 de los 11 controles durante el mismo período de tiempo en que los terneros secretaron activamente BRSV. No se registraron signos clínicos para el grupo vacunado durante el estudio. No se observaron reacciones adversas posteriores a la vacunación en ninguno de los terneros.

## Conclusiones

50 El informe anterior demuestra la eficacia de la fracción de BRSV del rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza3, vacuna contra el virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado, como una ayuda en la prevención de secreción de BRSV en terneros para carne/leche.

La eficacia y la antigenicidad de la fracción del BRSV de este producto combinado se comprueba por lo siguiente:

- 55 1) Los estudios de aislamiento de virus (BRSV) revelaron que la administración de una dosis de vacuna proporcionó un 86% (19/22) de protección en terneros vacunados en comparación con el 100% (11/11) de susceptibilidad en los controles (fracción prevenible = 0,8636).
- 2) Una disminución significativa en la frecuencia de secreción entre el grupo vacunado en comparación con el grupo de control. Los terneros de control secretaron BRSV durante 5,773 días más que los vacunados.
- 60 3) Un aumento significativo en los títulos de anticuerpos para BRSV del grupo vacunado en comparación con el grupo de control.

## Ejemplo 7 - Protocolo de eficacia para IBR (HBV-1)

65 Este ejemplo demuestra que la fracción viral BHV-1 de la vacuna MLV hexavalente ayuda en la prevención de IBR.

## Materiales y procedimientos



5 La vacuna con el virus vivo modificado hexavalente se prepara como se describió anteriormente. Brevemente, BHV-1 (cepa Cooper), BVDV-1a (cepa Singer), BVDV-1b (Cepa TGAC), BVDV-2 (125), PI<sub>3</sub> (Reisinger SF-4) y BRSV (N375) se propagan en la línea celular TVL-BK (vigésimo pase). Las fracciones individuales se recolectan en décimo pase y se mezclan en el producto de seis vías.

10 Se elabora un placebo sin BHV-1 junto con el serial de eficacia. El placebo sin BHV-1 contiene los mismos lotes de recolección de BVDV-1a, BVDV-1b, BVDV-2, PI<sub>3</sub> y BRSV que el serial de eficacia. El medio de cultivo se sustituye por el componente BHV-1 para mantener un volumen equivalente entre el serial de eficacia y el placebo sin BHV-1. El diluyente estéril se usa para rehidratar tanto la vacuna como el placebo sin BHV-1.

15 Se distribuyen al azar los terneros para carne/leche comerciales de aproximadamente 3-4 meses de edad como se describió anteriormente, luego se desparasitan y se vacunan contra la pasteurelisis, la micoplasmosis y el carbunco sintomático. A todos los terneros se les da acceso al agua, al heno costero de las Bermudas y a una ración de alimento mixto que contiene un coccidiostático, pero no antibióticos. La disponibilidad de heno puede ser posteriormente restringida después de que los terneros estén alimentados

20 En este estudio de un solo nivel se utilizan aproximadamente veinte o más vacunas y diez o más terneros de control. Los dos grupos de terneros se mantienen en corrales separados pero equivalentes antes de la exposición. Los terneros se mezclan en un corral, dos días antes de la exposición (día -2).

#### **Distribución aleatoria**

25 Se puede usar un esquema de distribución aleatoria pareado de los terneros para asignar a los terneros en dos grupos de tratamiento (vacunado o control vacunado con placebo). Por ejemplo, una secuencia de tres terneros que ingresan al callejón puede ser distribuida aleatoriamente en los dos grupos de tratamiento en una relación de 2:1. Las etiquetas de oreja, extraídas al azar de un cubo en el momento de la extracción de sangre inicial para la evaluación serológica, se utilizan para identificar a los terneros.

#### **30 Prueba ciega**

El personal que actúa a ciegas no tiene conocimiento de la identidad de los controles o vacunados, y todo el personal de campo y de laboratorio (con la excepción del encargado del registro), actúan en forma ciega durante todo el estudio.

#### **35 Resultado**

El resultado primario para este estudio es una diferencia en las lesiones nasales asociadas con IBR.

40 Esto se define como la presencia o ausencia de lesiones nasales. Otros signos clínicos de IBR, que incluyen la duración y la gravedad de las lesiones nasales, el aislamiento de BHV-1 de las narinas y la temperatura corporal, se consideran resultados secundarios.

45 Los puntajes mismos de las lesiones nasales se estiman como categorías ordinales. La duración y severidad de las lesiones en la mucosa nasal visible característica de IBR sirven como criterios para la evaluación. Los signos clínicos de enfermedad respiratoria y secreción nasal también pueden usarse como criterios para determinar la resistencia (no afectada) o la susceptibilidad (afectada) a la exposición. Las temperaturas rectales diarias individuales se analizan de forma rutinaria utilizando la temperatura promedio previa a la exposición (línea base) como covariable.

50 Las unidades experimentales se excluyen del estudio si tienen un título SN de BHV-1  $\geq 2$  al inicio del estudio.

55 Se recogen muestras de sangre de terneros inmediatamente antes de la vacunación (día -28 a día -21) con serial de eficacia o con placebo sin BHV-1. Las muestras de sangre también se toman inmediatamente antes de la exposición (Día 0) y nuevamente 14 días después de la exposición (Día 14).

#### **Estructuras de muestreo, recopilación de datos y observaciones clínicas**

60 Se recogen muestras nasales y se observan terneros para detectar lesiones visibles en la mucosa nasal y signos clínicos de IBR desde el Día 0 hasta el Día 14. Las temperaturas rectales se determinan para cada ternero desde el día -2 hasta el Día 14.

Las variables de resultado incluyen lesiones visibles de la mucosa nasal compatibles con IBR, temperaturas rectales, aislamiento del virus, títulos de anticuerpos y signos clínicos de IBR.

65 Las lesiones nasales graves de IBR han sido descritas por Rosner (1968). Las lesiones típicas observadas incluyen inflamación y edema de las fosas nasales con hemorragias y exudado fibronecrotico adherido a la mucosa. Rosner

ha informado que el exudado necrótico a veces es tan extenso en las fosas nasales que forma un exudado pseudomembranoso que se separa del tejido subyacente. Rosner también informa que estos hallazgos patológicos proporcionan un alto grado de confianza para realizar un diagnóstico presuntivo de IBR. Los puntajes de la lesión nasal pueden asignarse de acuerdo con los criterios establecidos, y los datos de duración analizados para demostrar si la vacunación tuvo un efecto atenuante sobre la duración en que se observaron las lesiones.

La evaluación de la temperatura rectal, el aislamiento del virus, los títulos de anticuerpos y los procedimientos estadísticos son como se describen en los ejemplos anteriores. Los signos clínicos de IBR han sido descritos por Rosner (1968) e incluyen, entre otros, respiración rápida, anorexia, pirexia, tos, secreción nasal, pérdida de peso y condición. Los signos clínicos se registran dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante los catorce días posteriores a la exposición. La observación de los signos clínicos de IBR puede tomarse en consideración durante el análisis de los datos, pero no se considera como un resultado primario, ya que estos signos también pueden ser indicativos de muchas otras enfermedades respiratorias que comúnmente se encuentran en el ganado comercial.

**Análisis estadístico:** las comparaciones de grupo de los títulos de anticuerpos se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS Learning Edición v2.0 para MS-Windows® como se describió anteriormente.

#### 20 **Ejemplo 7a - Estudio de eficacia para IBR (HBV-1)**

Los resultados de este estudio demuestran que la fracción del virus del herpesvirus bovino vivo modificado 1 (BHV-1) de la rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza3, virus del virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado, es antigénica y eficaz como ayuda en la reducción de la rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR). Se administraron dos dosis de la vacuna a veintidós terneros seronegativos para BHV-1. Doce terneros de control seronegativos fueron vacunados con dos dosis de una vacuna placebo comparable con el producto. Todos los terneros fueron expuestos intranasalmente con BHV-1. La vacunación dio como resultado un aumento del título de anticuerpos de BHV-1 y una reducción tanto en la duración como en la gravedad de las lesiones nasales asociadas con IBR. La vacunación también disminuyó la duración de la secreción y la respuesta febril que generalmente sigue a una exposición al BHV en terneros. En consecuencia, se ha establecido un TCID<sub>50</sub> mínimo de BHV-1 o de  $5 \times 10^3$  por dosis para la fracción de BHV-1 de esta vacuna.

#### **Materiales y procedimientos**

35 **Vacunación y exposición de los terneros:** Treinta y cuatro terneros negativos para BHV-1 se mezclaron en un callejón de clasificación. Cada ternero se separó con una puerta, ya que se arrearon al azar, tres terneros a la vez, a través del callejón en uno de los dos grupos (Grupo A, vacunados o Grupo B, controles vacunados con placebo) mediante el uso de un esquema de distribución aleatoria de grupos pareados proporcionado por CVB Biometrics.

40 Se vacunaron veintidós terneros con una dosis de rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza3, vacuna sincitial respiratoria, virus vivo modificado. A cada vacunado se le administró una dosis de 2 ml del producto mediante inyección subcutánea en el lado izquierdo del cuello en el Día 0. Se vacunaron doce terneros con una vacuna placebo comparable con el producto (sin BHV-1). Se recogieron frotis nasales para el aislamiento del virus BHV-1 y se extrajo sangre de todos los terneros para la confirmación serológica de la susceptibilidad al BHV-1. El día 13, los terneros vacunados y de control recibieron una segunda dosis de 2 ml de serial de eficacia y el producto se comparó con el placebo, subcutáneamente, en el lado derecho del cuello. Dos días antes de la exposición, los grupos de vacunación y control se mezclaron con el propósito de la observación clínica previa a la exposición y para obtener lecturas de la temperatura corporal de referencia.

50 Los terneros vacunados y de control se expusieron 15 días después de la segunda vacunación con 4 ml (2 ml por narina) del virus para exposición al BHV-1 proporcionado por el USDA-APHIS-CVB, cepa Coopers, número de lote 05-08, fecha de llenado, 26 de octubre de 2005.

55 El título del virus para la exposición se determinó por CVB como  $10^{8.2}$  TCID<sub>50</sub>/2 ml. El virus para la exposición se tituló inmediatamente antes de la exposición y se determinó que era  $10^{8.0}$  TCID<sub>50</sub>/4 ml y de nuevo inmediatamente después de la exposición y se determinó que era  $10^{7.4}$  TCID<sub>50</sub>/4 ml. El virus para la exposición se mantuvo refrigerado durante todo el proceso de exposición.

60 Se recogieron muestras de sangre el día de la vacunación, el día de la exposición y 14 días después de la exposición. Los títulos de anticuerpos contra el herpesvirus bovino se determinaron mediante el procedimiento de neutralización de suero que disminuye constantemente el virus.

Se recogieron los frotis nasales el día de la vacunación, el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

Las temperaturas rectales se registraron diariamente para cada ternero durante dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

5 Se realizaron observaciones clínicas y se asignaron puntuaciones de lesión nasal. Lesiones nasales graves causadas por BHV han sido divulgadas por S.F. Rosner, en JAVMA Vol. 153, No. 12, diciembre de 1968, páginas 1631-1638. Las lesiones típicas observadas incluyen inflamación y edema de las fosas nasales con hemorragias y exudado fibronectrótico adherido al revestimiento del moco. Rosner ha informado que el exudado necrótico a veces es tan extenso en las fosas nasales que forma un exudado pseudomembranoso que se separa del tejido subyacente. 10 Rosner también informa que estos hallazgos patológicos proporcionan un alto grado de confianza para realizar un diagnóstico presuntivo de IBR.

Las puntuaciones de lesión nasal se asignaron de acuerdo con los criterios enumerados a continuación:

Puntuación	Descripción
15	0. Ausencia de lesiones definitivas de la enfermedad por el virus de la IBR.
20	1. La presencia de lesiones características de la enfermedad IBR no excede el 10% de la membrana mucosa nasal visible.
25	2. La presencia de lesiones características de la enfermedad IBR que afectan al 11-25% de la membrana mucosa nasal visible.
	3. La presencia de lesiones características de la enfermedad IBR que afectan al 26-50% de la membrana mucosa nasal visible.
	4. La presencia de lesiones características de la enfermedad IBR que afectan a más del 50% de la membrana mucosa nasal visible.

30 Los observadores actuaron de forma ciega debido a que los grupos de vacunación y control se mezclaron siendo la única característica diferenciadora el número de etiqueta de oreja. En ningún momento a lo largo del estudio, los observadores tuvieron conocimiento del estado de vacunación de un animal de prueba individual. El personal de laboratorio no tenía conocimiento del estado de vacunación de los terneros.

35 **Detección de BHV-1:** se recogieron frotis nasales de terneros frotando ambas narinas con un BBL Culture Swab® en medio líquido de Stuart. La observación visual del CPE específico de BHV-1 junto con las técnicas de PCR mejoradas en cultivo celular se utilizaron para detectar BHV-1 en las muestras recolectadas. Brevemente, las muestras se procesaron por filtración estéril (0,2 µm) en células TVL-BK en cultivo. Los cultivos se incubaron durante 4 días a 37°C ± 2°C y 5 ± 1% de CO<sub>2</sub>. Los cultivos se observaron para CPE específico de BHV-1 y se registraron los resultados. El sobrenadante de todas las muestras de cultivo (tanto CPE + como -) se analizó individualmente para determinar la presencia/ausencia de BHV-1 utilizando la metodología de RT qPCR convencional y el siguiente grupo de sondas/cebadores:

45	Cebador directo:	CCATGTTAGCGCTCTGGAACC (SEQ ID NO: 16)
	Cebador inverso:	CGTCTTTACGGTCGACGACTCC (SEQ ID NO: 17)
	Sonda TaqMan MGB:	ACGGACGTGCGCGAA (SEQ ID NO: 18)

50 La especificidad del grupo de sonda/cebador se confirmó internamente y no reaccionó de forma cruzada con PI3, BRSV, BVDV1a, BVDV1b o BVDV2. Los ensayos de RT qPCR se realizaron utilizando ensayos basados en Taqman® en un Applied Biosystems 7500. Todas las muestras que eran positivas para CPE específicas de BHV-1 también fueron positivas para PCR. Hubo 8 muestras que fueron negativas para el CPE específico para BHV-1 y positivas para BHV mediante el ensayo de PCR. Esto es coherente con los estudios internos que indican que los ensayos basados en PCR son ligeramente más sensibles que los ensayos basados en la observación del CPE específico para BHV-1. Las muestras que resultaron negativas para BHV-1 después del cultivo inicial se subcultivaron y se observaron para CPE. 55

El sobrenadante de fluidos subcultivados se analizó para determinar la presencia/ausencia de BHV-1 de acuerdo con el mismo procedimiento.

60 **Lesiones nasales:** el resultado primario del estudio fueron las diferencias en las lesiones nasales asociadas con BHV-1. La fracción prevenida se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993) con base en la presencia o ausencia de lesiones en un ternero individual. Una fracción mitigada condicional estimada de la gravedad de las lesiones en los terneros afectados se determinó de acuerdo con B.J. Fergen, *Estimating an Intervention Effect on Outcome Severity*, USDA, CVB. La duración de las lesiones (el número de días desde el primer hasta el último día en que se observaron las lesiones) se determinó para cada ternero afectado y se estimó la diferencia en la duración de las lesiones entre los dos grupos. 65

**Temperatura corporal:** un resultado secundario del estudio fueron las diferencias en la temperatura corporal entre los terneros del grupo vacunado y de control. El análisis de las temperaturas rectales para los días 1-14 se realizó con un análisis de medidas repetidas de varianza (ANOVA) que incluye los términos para las interacciones de Grupo, Día y Grupo\*Día y utilizando las temperaturas de referencia como covariable. Dado que las interacciones Grupo\*Día fueron significativas ( $p < 0,5$ ), el grupo vacunado se comparó con el control a través del simple efecto de Grupo para cada punto de tiempo. Estas simples comparaciones de efectos se obtuvieron a partir de las interacciones Grupo\*Día.

**Secreción de virus:** otro resultado secundario del estudio fue la diferencia en la secreción de BHV posterior a la exposición entre los terneros vacunados y los de control. La fracción prevenida se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993) basándose en el aislamiento y la identificación de BHV en muestras nasales de un ternero individual. La duración de la secreción (la cantidad de días desde la primera hasta la última fecha en que se detectó BHV-1) se determinó para cada ternero afectado y se estimó la diferencia en la duración de la secreción entre los dos grupos.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS versión 17 para Windows.

## Resultados

**Títulos de anticuerpos de neutralización de suero:** Todos los terneros en este estudio tuvieron un título de anticuerpos de neutralización de suero de BHV-1 antes de la vacunación de  $< 1:2$ . Los 12 terneros en el grupo de control aún eran seronegativos el día de la exposición (título de anticuerpos de  $< 1:2$ ). Veintiuno de los 22 terneros en el grupo de vacunados fueron sero convirtieron con títulos de  $\geq 1:2$  al día de la exposición (título de la mediana del grupo de  $1:4$ ). A los 14 días después de la exposición, todos los terneros se habían sero convertido a BHV-1 (mediana del título de vacunado  $> 256$ , mediana del título del control 128).

**Lesiones nasales:** se observaron lesiones nasales en los 12 terneros de control (100%) y en 20 de los 22 terneros vacunados (91%). La fracción estimada evitada para las lesiones nasales observadas es del 9%. Una fracción mitigada estimada sobre la gravedad de los terneros afectados fue del 90% (CI 95%: 72%, 100%). Las lesiones entre los controles afectados fueron más graves que entre los vacunados afectados. La mediana de duración en que se observaron las lesiones nasales fue de 6 días para los vacunados y de 10,5 días para los controles. El cambio estimado en la duración entre los dos grupos fue de 4,5 días.

**Temperaturas rectales:** el análisis de la temperatura rectal posterior a la exposición utilizando la temperatura promedio antes de la exposición como covariable reveló un grupo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) y un grupo por efecto día. El análisis reveló que la temperatura del grupo de control fue significativamente mayor ( $p < 0,05$ ) desde el inicio en comparación con el grupo vacunado en los días 3 a 9 y el día 11 después de la exposición.

**Aislamiento de BHV-1:** todos los terneros de control y vacunados secretaron BHV-1 durante la fase posterior a la exposición de este estudio. La duración media del aislamiento de BHV-1 del grupo vacunado fue de 6 días y 10,5 días para los controles. El cambio estimado en la duración de la secreción fue de 4,5 días. Todas las muestras que exhiben CPE específico de BHV se confirmaron mediante PCR. Sin embargo, hubo 8 muestras en las que no se observó el CPE, pero tenían señales de PCR positivas débiles. Estas 8 muestras no fueron incluidas como positivas para este análisis.

**Signos clínicos de BHV-1:** Se examinó a cada animal para detectar signos clínicos de enfermedad respiratoria durante dos días consecutivos antes de la exposición, el día de la exposición y durante catorce días consecutivos después de la exposición. Se observaron y registraron los signos clínicos que podrían atribuirse a la infección por BHV-1. No se observaron reacciones adversas posteriores a la vacunación en ninguno de los terneros.

## Conclusiones

El informe anterior demuestra la eficacia de la fracción del BHV-1 de rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza3, vacuna contra el virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado como ayuda en la reducción de la enfermedad debida al BHV-1 en terneros para carne/leche. La eficacia y la antigenicidad de la fracción del BHV-1 de este producto combinado se demuestra a través de lo siguiente:

- 1) Una disminución en la gravedad y la duración de las lesiones nasales en el grupo de vacunados en comparación con el grupo de control.
- 2) Una disminución de la pirexia en el grupo vacunado en comparación con el grupo de control.
- 3) Sero conversión a BHV-1 del grupo vacunado en comparación con el grupo de control.

## Ejemplo 8 - protocolo de eficacia de PI<sub>3</sub>

Este ejemplo demuestra que la fracción de PI<sub>3</sub> de la vacuna del MLV hexavalente ayuda en la prevención de la enfermedad causada por PI<sub>3</sub>.

### 5 **Materiales y procedimientos**

La vacuna de virus vivo modificado hexavalente se prepara como se describió anteriormente. Se elabora un placebo sin PI<sub>3</sub> junto con el serial de eficacia. El placebo sin PI<sub>3</sub> contiene los mismos lotes de recolección de BHV-1, BVDV-1b, BVDV-2, BVDV-1a y BRSV que el serial de eficacia. El medio de cultivo se sustituye por el componente de PI<sub>3</sub> para mantener un volumen equivalente entre el serial de eficacia y el placebo sin PI<sub>3</sub>. Se utiliza un diluyente estéril para rehidratar tanto la vacuna como el placebo sin PI<sub>3</sub>.

Se distribuyen aleatoriamente a los terneros para carne/leche comerciales de aproximadamente 3-4 meses de edad como se describió anteriormente, luego se desparasitan y se vacunan contra la pasteurelosis, la micoplasmosis y el carbunco sintomático. A todos los terneros se les da acceso libre al agua, al heno costero de las Bermudas y a una ración de alimento mixto que contiene un coccidiostático, pero no antibióticos. La disponibilidad de heno puede ser posteriormente restringida después de que los terneros estén alimentados.

Aproximadamente veinte o más terneros vacunados y diez o más terneros de control se utilizan en este estudio de un solo nivel. Los dos grupos de terneros se mantienen en corrales separados pero equivalentes antes de la exposición. Los terneros se mezclan en un corral, dos días antes de la exposición (día -2).

### 20 **Distribución aleatoria**

Se puede usar un esquema de distribución aleatoria pareado de los terneros para asignar a los terneros en dos grupos de tratamiento (vacunado o control vacunado con placebo). Por ejemplo, una secuencia de tres terneros que ingresan al callejón puede ser distribuida aleatoriamente en los dos grupos de tratamiento en una proporción de 2:1. Las etiquetas de oreja, extraídas al azar de un cubo en el momento de la extracción de sangre inicial para la evaluación serológica, se utilizan para identificar a los terneros.

### 30 **Prueba ciega**

El personal no tenía conocimiento de la identidad de los controles o de los vacunados. Todo el personal de campo y de laboratorio, con excepción del encargado del registro, trabajo en forma ciega para el estudio.

### 35 **Resultado**

El resultado primario de este estudio es la prevención de la secreción nasal del virus PI<sub>3</sub> después de la exposición. Esto se determina por la presencia o ausencia de PI<sub>3</sub> en muestras nasales recolectadas diariamente de las narinas de todos los terneros durante el curso del estudio. Otros resultados secundarios anticipados incluyen la disminución de los signos clínicos de la infección por PI<sub>3</sub>, la reducción de la pirexia y la reducción de la duración del secreción de los terneros que secretan PI<sub>3</sub>. Las unidades experimentales se excluyen del estudio si tienen un título de PI<sub>3</sub> de  $\geq 2$  al inicio del estudio.

### 45 **Estructuras de muestreo, recopilación de datos y observaciones clínicas**

Se recogen muestras de sangre de terneros inmediatamente antes de la vacunación (días -28 a -21) con serial de eficacia o placebo sin PI<sub>3</sub>. Las muestras de sangre también se recogen inmediatamente antes de la exposición (Día 0) y nuevamente 14 días después de la exposición (Día 14). Las muestras de sangre para los recuentos diferenciales de WBC se recogen desde el día -2 hasta el Día 14. Todas las muestras se recogen en tubos Vacutainer® con EDTA, y los recuentos se realizan utilizando un contador diferencial de WBC Hemavet 950 de Drew Scientific. Se toman frotis nasales para el aislamiento del virus desde el día -2 hasta al menos el Día 14.

La secreción de PI<sub>3</sub> por los grupos vacunado y de control se determina diariamente durante 14 días después de la exposición. La detección de PI<sub>3</sub> sirve como el criterio principal para determinar la resistencia (no afectada) o la susceptibilidad (afectada) a la exposición. Los grupos afectados y no afectados se comparan para determinar si la vacunación previno la secreción de PI<sub>3</sub> después de la exposición a PI<sub>3</sub>. Los signos clínicos de la enfermedad respiratoria sirven como un criterio secundario para determinar la susceptibilidad o la resistencia a la exposición. La duración de la secreción (número de días en que se detectó PI<sub>3</sub> de un ternero individual) se analiza para determinar si la vacunación tuvo un efecto atenuante en este parámetro. Todas las temperaturas rectales diarias individuales se analizan utilizando la temperatura promedio previa a la exposición (línea de base) como covariable.

**Detección de PI<sub>3</sub>:** Los frotis nasales se toman de cada ternero el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición frotando ambos orificios nasales con un BBL Culture Swab® con medio líquido de Stuart. El medio de las muestras se analiza para determinar la presencia de PI<sub>3</sub> mediante PCR en tiempo real utilizando el grupo de sonda/cebador específico de PI<sub>3</sub> descrito en el presente documento.

**Duración de la secreción:** La duración de la secreción se define como el número de días que se detectó PI<sub>3</sub> en los frotis nasales de un ternero individual. Los datos de duración recopilados se analizan para determinar si la vacunación tuvo un efecto mitigador sobre el tiempo en que se detectó PI<sub>3</sub> en muestras nasales.

5 **Temperatura rectal:** Las temperaturas rectales diarias de cada animal se registran entre el Día -2 y el Día 14 (2 días antes de la exposición, el día de la exposición y 14 días después de la exposición). Se calcula una media antes de la exposición para cada animal promediando los valores de temperatura de los Días -2 a Día 0. Las temperaturas diarias se analizan utilizando la línea de base como covariable.

10 **Títulos de anticuerpos:** Los títulos de anticuerpos de neutralización del suero se determinan mediante el procedimiento del suero que disminuye constantemente el virus para cada animal el día de la vacunación, el Día 0 y el Día 14 del estudio.

15 **Signos clínicos:** Los signos clínicos de PI<sub>3</sub> han sido descritos por Brysonet et al. (1989). Los signos clínicos incluyen, entre otros, embotamiento, respiración rápida, pirexia, tos, los sonidos adventicios y/o estridentes de los pulmones. Los signos clínicos se registran dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante los catorce días posteriores a la exposición. La observación de los signos clínicos de PI<sub>3</sub> se tiene en cuenta durante el análisis de los datos, pero no se considera un resultado primario debido al hecho de que estos signos pueden ser indicativos de muchas enfermedades respiratorias que se encuentran comúnmente en el ganado comercial.

20 **Ejemplo 8a - Estudio de eficacia de PI<sub>3</sub>**

Los resultados de este estudio demuestran que la fracción del virus de paraifluenza<sub>3</sub> (PI<sub>3</sub>) bovina vivo modificado de la rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza<sub>3</sub>, vacuna contra el virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado, es antigénica y eficaz como ayuda en la prevención de secreciones del virus de parainfluenza<sub>3</sub> bovina en terneros para carne/leche. Se administraron dos dosis de vacuna a veinte terneros seronegativos para PI<sub>3</sub>. Se vacunaron diez terneros de control seronegativo con dos dosis de una vacuna placebo comparable con el producto. Todos los terneros fueron expuestos en forma intranasal con PI<sub>3</sub>. La vacunación dio como resultado un aumento del título de anticuerpos de PI<sub>3</sub> e impidió la secreción de PI<sub>3</sub> después de la exposición. En consecuencia, se ha establecido un PI<sub>3</sub>-TCID<sub>50</sub> mínimo de 6 X 10<sup>4</sup> por dosis para la fracción de PI<sub>3</sub> de esta vacuna.

**Materiales y procedimientos**

35 **Vacunación y exposición de los terneros:** Treinta (30) terneros negativos para PI<sub>3</sub> se mezclaron en un callejón de clasificación. Cada ternero se separó con una puerta, ya que se arrearon al azar, tres terneros a la vez, a través del callejón en uno de los dos grupos (Grupo A, vacunados o Grupo B, controles vacunados con placebo) mediante el uso de un esquema de distribución aleatoria de grupos pareados proporcionado por CVB-Biometrics.

40 Se vacunaron veinte terneros con una dosis de rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza<sub>3</sub>, vacuna sincitial respiratoria, virus vivo modificado. A cada vacunado se le administró una dosis de 2 ml del producto mediante inyección subcutánea en el lado izquierdo del cuello en el día 0. Se vacunaron diez terneros con una vacuna placebo comparable con el producto (sin PI<sub>3</sub>). Se recogieron frotis nasales para el aislamiento del virus PI<sub>3</sub> y se extrajo sangre de todos los terneros para la confirmación serológica de la susceptibilidad a PI<sub>3</sub>. En el día 25, los terneros vacunados y de control recibieron una segunda dosis de 2 ml de serial de eficacia y el placebo comparable con el producto, por vía subcutánea, en el lado derecho del cuello. Dos días antes de la exposición, los grupos de vacunación y control se mezclaron para la observación clínica previa a la exposición y para obtener lecturas de la temperatura corporal de referencia. Los terneros vacunados y de control fueron expuestos 15 días después de la segunda vacunación con 4 ml (2 ml por cada orificio nasal) del virus para exposición PI<sub>3</sub> proporcionado por el USDA-APHIS-CVB, cepa Reisinger, Número de lote 05-07, Fecha de llenado: 26 de julio de 2005. El título del virus para la exposición se determinó por CVB en 10<sup>8.2</sup> TCID<sub>50</sub>/2 ml. El virus para la exposición se tituló inmediatamente antes de la exposición y se determinó que era 10<sup>8.3</sup> TCID<sub>50</sub>/4 ml y de nuevo inmediatamente después de la exposición y se determinó que era 10<sup>8.2</sup> TCID<sub>50</sub>/4 ml. El virus para la exposición se mantuvo frío durante todo el proceso de exposición.

55 Se recogieron muestras de sangre el día de la vacunación, seis días después de la vacunación, el día de la exposición, seis días después de la exposición y 14 días después de la exposición. Los títulos de anticuerpos del virus de parainfluenza<sub>3</sub> bovina se determinaron mediante el procedimiento de neutralización del suero que disminuye constantemente el virus.

60 Se recogieron frotis nasales el día de la vacunación, el día de la exposición y durante 10 días consecutivos después de la exposición.

Las temperaturas rectales se registraron diariamente para cada ternero durante dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

65

Se realizaron observaciones clínicas. Los observadores actuaron en forma ciega debido a que tanto los grupos vacunados como los grupos de control se mezclaron con la única característica diferenciadora que es el número de etiqueta de oreja. En ningún momento a lo largo del estudio, los observadores tuvieron conocimiento del estado de vacunación de un animal de prueba individual. El personal de laboratorio no tenía conocimiento del estado de vacunación de los terneros.

**Detección de PI<sub>3</sub>:** Se recogieron frotis nasales de terneros frotando ambos orificios nasales con un BBL culture Swab® en medio líquido de Stuart. La observación visual del CPE específico de PI<sub>3</sub> junto con técnicas de PCR mejoradas en cultivo celular se utilizaron para detectar PI<sub>3</sub> en las muestras recolectadas. Brevemente, las muestras se procesaron por filtración estéril (0,2 µm) en células TVL-BK en cultivo. Los cultivos se incubaron durante 4 días a 37°C ± 2°C y 5 ± 1% de CO<sub>2</sub>. Se observaron los cultivos para CPE específico de PI<sub>3</sub> y se registraron los resultados. El sobrenadante de todas las muestras de cultivo (tanto CPE + y -) se analizó individualmente para determinar la presencia/ausencia de PI<sub>3</sub> utilizando la metodología de RT qPCR convencional y el siguiente grupo de sondas/cebadores:

Cebador directo: GGAGACCAAGACCAAGGAGATG (SEQ ID NO: 13)

Cebador inverso: CGTCTGCCCATGCATAAGG (SEQ ID NO: 14)

Sonda TaqMan MGB: ACCTCGGTCATCCATAG (SEQ ID NO: 15)

Este procedimiento se desarrolló basándose en el trabajo de A. Hu et al., (Development of a real-time RT-PCR assay for detection and quantitation of parainfluenza virus 3. A. Hu, M. Colella, P. Zhao, F. Li, JS Tam, R. Rappaport, SM Cheng. Journal of Virological Methods, 130 (2005) 145-148). La especificidad del grupo sonda/cebador se confirmó internamente y no reaccionó de forma cruzada con BHV, BRSV, BVDV1a, BVDV1b o BVDV2. Los ensayos de RT qPCR se realizaron utilizando ensayos basados en Taqman® en un Applied Biosystems 7500.

Todas las muestras que eran positivas para CP3 específicas para PI<sub>3</sub> también eran positivas para PCR. Hubo 17 muestras que fueron negativas para el CPE específico de PI<sub>3</sub> y positivas para PI<sub>3</sub> mediante el ensayo de PCR.

Esto es consistente con los estudios internos que indican que los ensayos basados en PCR son más sensibles que los ensayos basados en la observación de un CPE específico de PI<sub>3</sub>. Las muestras que resultaron negativas para PI<sub>3</sub> después del cultivo inicial se subcultivaron y se observaron para CPE. El sobrenadante de fluidos subcultivados se analizó para determinar la presencia/ausencia de PI<sub>3</sub> de acuerdo con el mismo procedimiento.

**Análisis estadístico:** la eficacia de la fracción de PI<sub>3</sub> de esta vacuna se basó principalmente en la proporción de vacunados que secretaron PI<sub>3</sub> en comparación con la proporción de controles que secretaron PI<sub>3</sub> después de la exposición. La fracción prevenible se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993). Las comparaciones de grupo de los datos de títulos escalados de manera ordinaria se compararon mediante la prueba U de Mann-Whitney. Las temperaturas rectales se analizaron utilizando el promedio de temperatura antes de la exposición como covariable. El análisis de la temperatura posterior a la exposición para el día 1-14 se realizó con un análisis de varianza de medidas repetidas (ANOVA). Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SAS para Windows.

## Resultados

**Títulos de anticuerpos de neutralización de suero:** Todos los terneros en este estudio tuvieron un título de anticuerpos de neutralización de suero PI<sub>3</sub> antes de la vacunación de <1:2. Ninguno de los terneros vacunados demostró una respuesta inmune anamnésica a la vacuna. El día de la exposición, el grupo vacunado tenía un título de PI<sub>3</sub> promedio de 1:16, que fue significativamente mayor que ( $p \leq 0,05$ ) el del grupo control en 1:3. Un ternero en el grupo de control, ternero 7, desarrolló un título de 1:16 durante el curso del estudio. Este ternero también demostró una respuesta anamnésica a la exposición y tuvo un título de 1:128 seis días después de la exposición. Los otros nueve terneros de control fueron seronegativos el día de la exposición y no demostraron una respuesta anamnésica a la exposición.

**Aislamiento de PI<sub>3</sub>:** Los diez terneros de control en este estudio secretaron PI<sub>3</sub> durante la fase posterior a la exposición de este estudio. Solo 4 de los 20 vacunados secretaron PI<sub>3</sub> durante este tiempo. Esto resulta en una fracción prevenible de 0,80. Todas las muestras que exhiben CPE específico de PI<sub>3</sub> se confirmaron mediante PCR. Sin embargo, hubo 17 muestras en las que no se observó el CPE, pero tenían señales de PCR positivas débiles. Estas 17 muestras se han incluido como positivo para PI<sub>3</sub> para este análisis.

**Temperaturas rectales:** el análisis de la temperatura rectal posterior a la exposición utilizando la temperatura promedio antes de la exposición como covariable no reveló diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. No se realizó ningún análisis adicional de estos datos.

**Signos clínicos de PI<sub>3</sub>:** se examinó a cada animal para detectar signos clínicos de enfermedad respiratoria durante dos días consecutivos antes de la exposición, el día de la exposición y durante catorce días consecutivos después de la exposición. No se observaron signos clínicos que pudieran atribuirse definitivamente a la infección por PI<sub>3</sub>. No se observaron reacciones adversas posteriores a la vacunación en ninguno de los terneros.

Conclusiones

5 El informe anterior demuestra la eficacia de la fracción de PI<sub>3</sub>, de rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza3, vacuna contra el virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado como ayuda en la prevención de la secreción de PI<sub>3</sub> en terneros para carne/leche

La eficacia y la antigenicidad de la fracción de PI<sub>3</sub> de este producto combinado se comprueba por lo siguiente:

- 10 1) Los estudios de aislamiento de virus (PI<sub>3</sub>) revelaron que la administración de dos dosis de vacuna proporcionó una protección del 80% (16/20) en terneros vacunados en comparación con una susceptibilidad del 100% (10/10) en los controles (fracción prevenible = 0,80).  
 2) Un aumento significativo en los títulos de anticuerpos para PI<sub>3</sub> del grupo vacunado en comparación con el grupo de control.

15 **Ejemplo 9: Protocolo de eficacia de BVDV-2**

Este ejemplo demuestra que la fracción de BVDV tipo 2 de la vacuna de MLV hexavalente ayuda en la prevención de la enfermedad causada por BVDV-2.

20 **Materiales y procedimientos**

25 La vacuna de virus vivo modificada hexavalente se prepara como se describió anteriormente. Se elabora un placebo sin BVDV-2 junto con el serial de eficacia. El placebo sin BVDV-2 contiene los mismos lotes de recolección de BHV-1, BVDV-1b, BVDV-1a, PI<sub>3</sub> y BRSV que el serial de eficacia. El medio de cultivo se sustituye por el componente de BVDV-2 para mantener un volumen equivalente entre el serial de eficacia y el placebo sin BVDV-2. El diluyente estéril se usa para rehidratar tanto la vacuna como el placebo sin BVDV-2.

30 Se distribuyen al azar los terneros para carne/leche comerciales de aproximadamente 3-4 meses de edad como se divulgó anteriormente, luego se desparasitan y se vacunan contra la pasteurelosis, la micoplasmosis y carbunco sintomático. A todos los terneros se les da libre acceso al agua, al heno costero de las Bermudas y a una ración de alimento mixto que contiene un coccidiostático, pero no antibióticos. La disponibilidad de heno puede ser posteriormente restringida después de que los terneros estén alimentados.

35 Aproximadamente veinte o más terneros vacunados y diez o más terneros de control se utilizan en este estudio de un solo nivel. Los dos grupos de terneros se mantienen en corrales separados pero equivalentes antes de la exposición. Los terneros se mezclan en un corral, dos días antes de la exposición (día -2).

40 **Distribución aleatoria, prueba ciega y resultados**

La distribución aleatoria, prueba ciega y resultados, son como se divulga en el Ejemplo 10.

**Estructuras de muestreo, recopilación de datos y observaciones clínicas**

45 Se recogen muestras de sangre de terneros inmediatamente antes de la vacunación (días -28 a -21) con serial de eficacia o con placebo sin BVDV-2. Las muestras de sangre también se recogen inmediatamente antes de la exposición (Día 0) y nuevamente 14 días después de la exposición (Día 14).

50 Las muestras de sangre para los recuentos diferenciales de WBC se recogen desde el día -2 hasta al menos el día 14. Todas las muestras se recogen en tubos Vacutainer® con EDTA, y los recuentos se realizan utilizando un contador diferencial de WBC Hemavet 950 de Drew Scientific. Se toman frotis nasales para el aislamiento del virus desde el día -2 hasta al menos el Día 14.

55 Las variables de resultado incluyen leucopenia, pirexia, secreción nasal del virus, viremia, producción de anticuerpos neutralizantes y signos clínicos. El resultado primario es la prevención de leucopenia inducida por BVDV-2 en el grupo vacunado en comparación con el grupo de control después de la exposición a BVDV-2.

60 **Leucopenia:** los datos de recuento de WBC se analizan para determinar si hay una reducción en el recuento posterior a la exposición. Se calcula una media antes de la exposición para cada animal promediando los recuentos de WBC de los Días -2 a 0. Se calcula la proporción de recuentos diarios de WBC con respecto a la media antes de la exposición (recuento de WBC como una proporción de la exposición previa) para cada día 1-14 posterior a la exposición o más a discreción de los observadores. Si la proporción disminuye en un 25%, el individuo se clasifica como leucopénico.

65 **Secreción:** se toman frotis nasales de cada ternero el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición frotando ambos orificios nasales con un BBL Culture Swab® con medio líquido de Stuart. El día de



la recolección, las muestras se procesan por filtración estéril a través de un filtro de 0,2 µm. Cada pozo de una placa de 12 pozos que contiene TVL-MDBK (aproximadamente con 80% de confluencia) se inocula luego con una muestra. Un pozo por placa permanece sin inocular y sirve como control negativo. Un pozo de la placa se inocula con una dilución del virus para exposición y sirve como control positivo. Las placas se incuban a 3-7% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 35-39°C durante 2 a 4 días. Los medios de cada pozo se recolectan y almacenan de -18 a -22°C. Los medios de los pozos que exhiben la morfología citopática típica de BVDV-1a se procesan para determinar la identidad del agente infeccioso. Los individuos que tienen un cultivo positivo se clasifican como "secretores".

**Viremia:** se utilizan capas leucocitarias de muestras de sangre para inocular cada pozo de una placa de 12 pozos que contiene TVL-MDBK (~ 80% de confluencia). Un pozo por placa permanece sin inocular y sirve como control negativo. Un pozo de la placa se inocula con una dilución del virus para exposición y sirve como control positivo. Las placas se incuban a 3-7% de CO<sub>2</sub> a una temperatura de 35-39°C durante 2 a 4 días. Los medios de cada pozo se recolectan y almacenan de -18 a -22°C. Los medios de los pozos que exhiben la morfología citopática típica de BVDV-2 se procesan para determinar la identidad del agente infeccioso. Los individuos que tienen un cultivo positivo para BVDV-2 se consideran "virémicos".

**Títulos de anticuerpos:** los títulos de anticuerpos de neutralización de suero contra BVDV-2 se determinan mediante el procedimiento de suero que disminuye constantemente el virus para cada animal el día de la vacunación inicial (día -21), el día de la exposición (Día 0) y al final del estudio. Los títulos de anticuerpos se determinan de acuerdo con el esquema especial A-17, valoración del anticuerpo neutralizador del virus de la diarrea vírica bovina tipo 2. Los animales que desarrollan un título de anticuerpos ≥8 se consideran sero-convertidos a BVDV-2.

**Signos clínicos:** los signos clínicos de BVDV-2 pueden incluir, entre otros, pirexia, leucopenia, disnea, secreción nasal y deposiciones sueltas. Todos los signos clínicos relevantes de la infección por BVDV se registran dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante los 14 días posteriores a la exposición. La observación de los signos clínicos de BVDV-2 se tiene en cuenta durante el análisis de los datos, pero no se considera como un resultado primario porque estos signos pueden ser indicativos de otras enfermedades que comúnmente se encuentran en esta clase de ganado.

#### 30 **Ejemplo 9A: Estudio de eficacia BVDV-2**

Los resultados de este estudio demuestran que la fracción del virus de la diarrea viral bovina viva tipo 2 (BVDV2) de la rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza3, vacuna contra el virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado, es antigénica y eficaz como ayuda en la prevención de las enfermedades causadas por BVDV2. Se administró una dosis a veinte terneros seronegativos con BVDV. Se vacunaron diez terneros de control seronegativos con una dosis de una vacuna placebo comparable con el producto. Todos los terneros fueron expuestos intranasalmente con BVDV2 (cepa 1373). La vacunación dio como resultado un aumento en el título de anticuerpos contra BVDV2 (de un promedio de <2 a 24), una reducción en la tasa de muerte después de la exposición (7/10 controles muertos, 0/20 vacunados muertos). En consecuencia, se ha establecido una dosis mínima de BVDV2-TCID<sub>50</sub> de 3 X 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> por dosis para la fracción de BVDV2 de esta vacuna.

#### 45 **Ejemplo 10: Protocolo de eficacia BVDV-1A**

Este ejemplo demuestra que la fracción de BVDV Tipo 1a de la vacuna de MLV hexavalente ayuda en la prevención de la enfermedad causada por BVDV-1a.

##### **Materiales y procedimientos**

La vacuna con virus vivo modificado con hexavalente se prepara como se describió anteriormente.

Se elaboró un placebo sin BVDV-1a junto con el serial de eficacia. El placebo sin BVDV-1a contiene los mismos lotes de recolección de BHV-1, BVDV-1b, BVDV-2, PI<sub>3</sub> y BRSV que el serial de eficacia. El medio de cultivo se sustituye por el componente BVDV-1a para mantener un volumen equivalente entre el serial de eficacia y el placebo sin BVDV-1a. El diluyente estéril se usa para rehidratar tanto la vacuna como el placebo sin BVDV-1a.

Se distribuyen aleatoriamente los terneros para carne/leche comerciales que tienen aproximadamente 3-4 meses de edad como se describió anteriormente, luego se desparasitan y se vacunan contra la pasteurelisis, la micoplasmosis y carbunco sintomático. A todos los terneros se les da libre acceso al agua, al heno costero de las Bermudas y a una ración de alimento mixto que contiene coccidiostático, pero no antibióticos. La disponibilidad de heno puede ser posteriormente restringida después de que los terneros estén alimentados

En este estudio de un solo nivel se usan aproximadamente veinte o más vacunas y diez o más terneros de control. Los dos grupos de terneros se mantienen en corrales separados pero equivalentes antes de la exposición. Los terneros se mezclan en un corral, dos días antes de la exposición (día -2).

#### 65 **Distribución aleatoria**

Se puede usar un esquema de distribución aleatoria pareado de los terneros para asignar a los terneros en dos grupos de tratamiento (vacunados o de control vacunados con placebo). Por ejemplo, una secuencia de tres terneros que ingresan al callejón puede ser distribuida aleatoriamente en los dos grupos de tratamiento en una proporción de 2:1. Las etiquetas de oreja, extraídas al azar de un cubo en el momento de la extracción de sangre inicial para la evaluación serológica, se utilizan para identificar a los terneros.

### Prueba ciega

El personal no tenía conocimiento de la identidad de los controles o de los vacunados; todo el personal de campo y de laboratorio (con excepción del encargado del registro), trabajo en forma ciega para el estudio.

### Resultado

El resultado primario es la leucopenia después de la exposición. La leucopenia se define como una disminución del 25% con respecto a los recuentos básicos de WBC. Otros resultados que respaldarían aún más la eficacia de la vacuna incluyen la secreción nasal, viremia, pirexia, producción de anticuerpos y signos clínicos de BVDV.

Las unidades experimentales se excluyen del estudio si tienen un título de BVDV-1 de  $\geq 2$  al inicio del estudio.

### Estructuras de muestreo, recopilación de datos y observaciones clínicas

Las muestras de sangre se recogen de terneros inmediatamente antes de la vacunación (días -28 a -21) con serial de eficacia o placebo sin BVDV. Las muestras de sangre también se recogen inmediatamente antes de la exposición (Día 0) y nuevamente 14 días después de la exposición (Día 14). Las muestras de sangre para los recuentos diferenciales de WBC se recogen desde el día -2 hasta al menos el Día 14. Todas las muestras se recogen en tubos Vacutainer® con EDTA, y los recuentos se realizan utilizando un contador diferencial de WBC Hemavet 950 de Drew Scientific. Se toman frotis nasales para el aislamiento del virus desde el día -2 hasta al menos el Día 14.

Las variables de resultado incluyen leucopenia, pirexia, secreción nasal del virus, viremia, producción de anticuerpos neutralizantes y signos clínicos. El resultado primario es la prevención de la leucopenia inducida por BVDV en el grupo vacunado en comparación con el grupo de control después de la exposición a BVDV-1a.

**Leucopenia, secreción y viremia:** los datos del recuento de WBC se analizan como se describe en el Ejemplo 9; los frotis nasales se toman de cada ternero el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición frotando ambos orificios nasales con un BBL Culture Swab® con medio líquido de Stuart para determinar la secreción, también como se describe en el Ejemplo 9. Las capas leucocitarias de muestras de sangre se utilizan para inocular cada pozo de una placa de 12 pozos que contiene TVL-MDBK (aproximadamente 80% de confluencia) y se analizan como se describe en el Ejemplo 9.

**Títulos de anticuerpos:** los títulos de anticuerpos de neutralización de suero contra BVDV-1a se determinan mediante el procedimiento de "suero que disminuye constantemente el virus" para cada animal el día de vacunación inicial (día -21), el día de la exposición (Día 0) y a al final del estudio. Los títulos de anticuerpos se determinan de acuerdo con el esquema especial A-17, valoración del anticuerpo neutralizador del virus de la diarrea viral bovina tipo 1a. Los animales que desarrollan un título de anticuerpos  $\geq 8$  se consideran sero-convertidos a BVDV-1a.

**Signos clínicos:** los signos clínicos de BVDV-1a pueden incluir, entre otros, pirexia, leucopenia, disnea, secreción nasal y deposiciones sueltas. Todos los signos clínicos relevantes de la infección por BVDV se registran dos días antes de la exposición, el día de la exposición y durante los 14 días posteriores a la exposición. La observación de los signos clínicos de BVDV-1 se toma en consideración durante el análisis de los datos, pero no se considera como un resultado primario porque estos signos pueden ser indicativos de otras enfermedades comunes que se encuentran en esta clase de ganado.

### Ejemplo 10A: Estudio de la eficacia de BVDV-1a

Los resultados de este estudio demuestran que la fracción del virus de la diarrea viral bovina viva tipo 1a (BVDV1a) de la rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza<sub>3</sub>, vacuna contra el virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado, es antigénica y eficaz como una ayuda en la prevención de la infección causada por BVDV1a. Se administró una dosis de vacuna a veinte terneros seronegativos para BVDV. Se vacunaron diez terneros de control seronegativos con una dosis de una vacuna placebo comparable con el producto. Todos los terneros fueron expuestos intranasalmente con BVDV1a. La vacunación dio como resultado un aumento del título de anticuerpos contra BVDV1a y previno o redujo la viremia inducida por BVDV1a, secreción nasal, pirexia, linfopenia y leucopenia. En consecuencia, se ha establecido una dosis mínima de BVDV1a-TCID<sub>50</sub> de  $5 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> por dosis para la fracción del BVDV1a de esta vacuna.

### Materiales y procedimientos

**Vacunación, exposición y recolección de muestras:** Se mezclaron treinta terneros negativos para BVDV en un callejón de clasificación. Cada ternero se separó con una puerta, ya que se arreararon al azar, tres terneros a la vez, a través del callejón en uno de los dos grupos (Grupo A, vacunados o Grupo B, controles vacunados con placebo) mediante el uso de un esquema de distribución aleatoria de grupos pareados proporcionado por CVB Biometrics

Se vacunaron 20 terneros con una dosis de rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza<sub>3</sub>, vacuna sincitial respiratoria, virus vivo modificado. A cada vacunado se le administró una dosis de 2 ml del producto mediante inyección subcutánea en el lado izquierdo del cuello en el Día 0. Se vacunaron diez terneros con una vacuna placebo comparable con el producto (sin BVDV). Dos días antes de la exposición, tanto los grupos vacunados como los grupos de control se mezclaron con el propósito de realizar una observación clínica previa a la exposición y adquirir la temperatura corporal basal y las lecturas de WBC. Los terneros vacunados y de control se expusieron 21 días después de la vacunación con un aislado virulento de BVDV1a obtenido de los pulmones de un ternero muerto en el corral Ruff Farms en Hanston, Kansas. El virus se había pasado *in vitro* a células TVL-BK utilizando el medio Eagle modificado de Dulbecco con un 10% de suero equino. El virus para la exposición se tituló inmediatamente antes de la exposición y se determinó que era  $10^{7.8}$  TCID<sub>50</sub>/4 ml e inmediatamente después de la exposición y se determinó que era de  $10^{7.3}$  TCID<sub>50</sub>/4 ml. Se administraron dos ml de virus para la exposición en cada fosa nasal durante la inspiración.

El virus para exposición se mantuvo refrigerado durante todo el proceso de exposición.

Se recogieron muestras de sangre para determinar los títulos de anticuerpos antes de la vacunación, el día de la exposición (21 días después de la vacunación) y 14 días después de la exposición. Los títulos de anticuerpos contra el virus de la diarrea viral bovina se determinaron mediante el procedimiento de neutralización del suero que disminuye constantemente el virus.

Los frotis nasales para el aislamiento del virus se recogieron de terneros frotando ambas orificios nasales con un BBL Culture Swab® en medio líquido de Stuart el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

Las muestras de sangre para el aislamiento del virus de la capa leucocitaria se recogieron de cada ternero mediante punción venosa en un tubo Vacutainer con EDTA el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

Las temperaturas rectales se registraron diariamente para cada ternero durante dos días consecutivos antes de la exposición, el día de la exposición y durante 14 días consecutivos después de la exposición.

Se realizaron y registraron observaciones clínicas para cada ternero. Los observadores actuaron en forma ciega debido a que tanto los grupos vacunados como los grupos de control se mezclaron con la única característica diferenciadora que es el número de etiqueta de la oreja. En ningún momento a lo largo del estudio, los observadores tuvieron conocimiento del estado de vacunación de un animal de prueba individual. El personal de laboratorio no tenía conocimiento del estado de vacunación de los terneros.

Las muestras de sangre para determinar los recuentos diferenciales de WBC se recolectaron durante dos días consecutivos antes de la exposición, el día de la exposición y 14 días consecutivos después de la exposición. Las muestras se recolectaron en tubos Vacutainer® con EDTA y los recuentos se realizaron utilizando un contador diferencial de WBC Hemavet 950 de Drew Scientific.

**Detección de BVDV:** se utilizaron la observación de CPE y técnicas de PCR mejoradas en cultivo celular para detectar BVDV1a en muestras recolectadas. Brevemente, las muestras nasales se procesaron mediante filtración estéril (0,2 µm) en células TVL-BK en cultivo. Las capas leucocitarias se colocaron directamente en células TVL-BK en cultivo durante 45-75 minutos antes de ser lavadas de las células. Los cultivos se incubaron durante 4 días a  $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y  $5 \pm 1\%$  de CO<sub>2</sub>. Cada cultivo se observó para detectar la presencia/ausencia de CPE específico de BVDV y el sobrenadante de cada cultivo se analizó individualmente para determinar la presencia/ausencia de BVDV1a utilizando la metodología de RT qPCR convencional y el siguiente grupo de sonda/cebador:

Cebador directo: GGTCGCCAGGTAAGCA (SEQ ID NO: 7)  
 Cebador inverso: GCCTCTGCAGCACCTATCA (SEQ ID NO: 8)  
 Sonda TaqMan MGB: AACCGACTGTTACGAATAC (SEQ ID NO: 9).

Este procedimiento fue desarrollado con base en (Differentiation of types 1a, 1b and 2 bovine viral diarrhea virus (BVDV) by PCR, Julia F. Ridpath y Steven R. Bolin, Molecular and Cellular probes, Journal of Virological Methods, 130 (2005) 145-148). Este procedimiento también se basa en el Protocolo de Prueba del Centro para Compuestos Biológicos Veterinarios y los Laboratorios Nacionales de Servicios Veterinarios - Genotipado del Virus de la Diarrea Viral Bovina, Número BPPR02010.01. Ambos procedimientos de diferenciación de genotipos y subgenotipos de BVDV explotan las diferencias genéticas que existen en la región 5' no traducida (UTR) del genoma. Este grupo de sonda/cebador se diseñó específicamente para amplificar una sección de la UTR 5' en la que la sonda altamente específica puede detectar una única secuencia de BVDV1b. La especificidad del grupo de sonda/cebador se

confirmó internamente y no reaccionó de forma cruzada con BHV, PI<sub>3</sub>, BRSV, BVDV1a o BVDV2. Los ensayos de RT qPCR se realizaron utilizando ensayos basados en Taqman® en un Applied Biosystems 7500.

5 **Análisis estadístico:** títulos de anticuerpos: las comparaciones de grupo de los títulos escalados de forma ordinaria se analizaron con la prueba U de Mann-Whitney.

10 **Secreción nasal:** los datos de aislamiento del virus del análisis de frotis nasal se basan en la proporción de vacunados de los cuales se aisló BVDV1a en comparación con la proporción de controles en los que se aisló BVDV1a después de la exposición. Las fracciones prevenibles se calcularon con base en la observación del CPE y la detección por PCR de forma independiente. La fracción prevenible para la secreción de BVDV1a se calculó de acuerdo a lo descrito por Tanner y Morgan (1993).

15 **Viremia:** los datos de aislamiento del virus de las capas leucocitarias de las muestras de sangre se analizaron en función de la proporción de vacunados de los cuales se aisló BVDV1a en comparación con la proporción de controles en los que se aisló BVDV1a después de la exposición. Las fracciones prevenibles se calcularon con base en la observación del CPE y la detección por PCR de forma independiente. La fracción prevenible para la viremia por BVDV1a se calculó de acuerdo a lo descrito por Tanner y Morgan (1993).

20 **Temperatura rectal:** Se determinó una temperatura rectal promedio antes de la exposición para cada animal. Este promedio se usó como covariable en un análisis de varianza de mediciones repetidas (ANOVA) que incluyó términos para las interacciones de Grupo, Día y Grupo\*Día.

25 **Signos clínicos de la enfermedad:** los signos clínicos de la enfermedad se registraron diariamente por cada observador de forma independiente.

30 **Linfopenia:** se calculó una media de linfocitos previos a la exposición para cada animal promediando los recuentos de linfocitos de los Días -2 a 0. Se calculó la proporción de recuentos de linfocitos diarios en relación con la media previa a la exposición (recuento de linfocitos como una proporción previa a la exposición) para cada día 1-14 posterior a la exposición. Esta proporción de datos se analizó para determinar si los animales individuales desarrollaron una linfopenia como se define por una disminución del 25% en los recuentos desde el inicio. La fracción prevenible se calculó de acuerdo a lo descrito por Tanner y Morgan (1993) para determinar si la vacunación previno el desarrollo de linfopenia en este estudio

35 **Leucopenia:** se calculó una media de leucocitos antes de la exposición para cada animal promediando los recuentos de leucocitos de los Días -2 a 0. Se calculó la relación de recuentos diarios de leucocitos en relación con respecto a la media previa a la exposición (recuento de leucocitos como una proporción previa a la exposición) para cada día 1-14 posterior a la exposición. Esta proporción de datos se analizó para determinar si los animales individuales desarrollaron una leucopenia como se define por una disminución del 25% en los recuentos desde el inicio. La fracción prevenible se calculó según lo descrito por Tanner y Morgan (1993) para determinar si la vacunación previno el desarrollo de leucopenia en este estudio.

Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando SPSS versión 16 para Windows.

## 45 Resultados

50 **Títulos de anticuerpos de neutralización de suero:** Todos los terneros en este estudio tenían un título de anticuerpos de neutralización de suero de BVDV (BVDV1a, BVDV1b y BVDV2) antes de la vacunación de <1:2. El día de la exposición (día 21), el grupo vacunado tenía un título de BVDV1a promedio de 1:21 que fue significativamente mayor ( $p \leq 0,05$ ) que el del grupo de control <1:2. Los títulos de anticuerpos contra BVDV1a aumentaron 14 días después de la exposición tanto en los terneros de control como en los vacunados, lo que indica que los terneros habían sido expuestos con BVDV1a.

55 **Aislamiento de BVDV1a a partir de frotis nasales:** con base en la observación del CPE específico del BVDV, los diez terneros de control en este estudio secretaron BVDV1a durante la fase posterior a la exposición de este estudio. Solo 3 de los 20 vacunados secretaron BVDV 1a durante el período posterior a la exposición. Se calculó una fracción prevenible utilizando una proporción de 0/10 controles naturalmente protegidos y 17/20 vacunados protegidos. Esto da lugar a una fracción prevenible de 0,85.

60 En función de la detección por PCR mejorada del cultivo celular de BVDV1a, los diez terneros de control en este estudio secretaron BVDV1b durante la fase posterior a la exposición de este estudio. Solo 5 de los 20 vacunados secretaron BVDV1a durante el período posterior a la exposición. Se calculó una fracción prevenible utilizando una proporción de 0/10 controles protegidos naturalmente y 15/20 vacunados protegidos. Esto resulta en una fracción prevenible de 0,75.

65 **Aislamiento de BVDV1a de capas leucocitarias:** basado en la observación del CPE específico de BVDV, seis de los diez terneros de control en este estudio fueron virémicos durante la fase posterior a la exposición de este

estudio. Ninguno de los 20 vacunados fue virémico durante el período posterior a la exposición. Se calculó una fracción prevenible utilizando una proporción de 4/10 controles protegidos naturalmente y 20/20 vacunados protegidos. Esto resulta en una fracción prevenible de 1,0.

5 Sobre la base de la detección por PCR mejorada del cultivo celular de BVDV1a, siete de los diez controles en este estudio fueron virémicos durante la fase posterior a la exposición de este estudio. Dos de los 20 vacunados fueron virémicos durante el período posterior a la exposición. Se calculó una fracción prevenible utilizando una proporción de 3/10 controles protegidos naturalmente y 18/20 vacunados protegidos. Esto resulta en una fracción prevenible de 0,86.

10 **Temperaturas rectales:** el análisis de temperatura rectal posterior a la prueba utilizando la temperatura promedio antes de la prueba como covariable reveló un grupo estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ) y efectos de grupo por día. El análisis reveló que la temperatura del grupo de control fue significativamente mayor que la del grupo vacunado en los días 6, 8 y 14 y alcanzó significancia en los días 5 y 11.

15 **Signos clínicos de BVDV1a:** un ternero en el grupo de control demostró signos clínicos que podrían contribuir a la infección por BVDV1a. El signo clínico observado en el ternero 21 fue una cantidad abundante de secreción nasal mucopurulenta. Ninguno de los terneros en el grupo de vacunados demostró signos clínicos de infección por BVDV1a durante la fase posterior a la exposición del estudio. No se observaron reacciones adversas posteriores a la  
20 vacunación en ninguno de los terneros.

**Linfopenia:** se detectó linfopenia en dos de los 20 vacunados y en cinco de los diez controles, lo que resultó en una fracción prevenible del 80%. Los promedios diarios de los datos de proporción revelan una respuesta típica de los terneros de control a la exposición por BVDV (linfopenia seguida de un pico de rebote). Los terneros vacunados no respondieron de la misma manera.

**Leucopenia:** se detectó leucopenia en cinco de los 20 vacunados y cuatro de los diez controles, lo que dio como resultado una fracción prevenible del 37%. Los promedios diarios de los datos de proporción se representan gráficamente en la Figura 3.

30 Conclusiones

El informe anterior demuestra la antigenicidad y la eficacia de la fracción del BVDV1a de rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza<sub>3</sub>, vacuna contra el virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado como ayuda en la  
35 prevención de la infección causada por BVDV1a.

La antigenicidad y la eficacia de la fracción del BVDV1a de este producto combinado se atestiguan por lo siguiente:

- 40 1) Un aumento significativo en los títulos de anticuerpos para BVDV1a en el grupo de vacunados en comparación con el grupo de control. Diecinueve de los 20 terneros en el grupo de vacunados desarrollaron títulos de BVDV1a  $\geq 1:8$  después de la administración de una dosis de 2 ml de vacuna, cumpliendo con los requisitos definidos en 9CFR 113.311 (c) (5).
- 45 2) Los estudios de aislamiento de virus revelaron que la administración de una dosis disminuyó la secreción nasal inducida por BVDV1a y la viremia en los terneros después de la exposición.
- 3) Los terneros vacunados exhibieron significativamente menos fiebre en comparación con los terneros de control.
- 4) La vacunación también disminuyó la linfopenia inducida por BVDV1a y la leucopenia en los terneros después de la exposición.

50 Los hallazgos del estudio son estadísticamente significativos y clínicamente relevantes, por lo tanto, demuestran la eficacia de la fracción del BVDV1a contenida en rinotraqueitis bovina, diarrea viral, parainfluenza<sub>3</sub>, vacuna contra el virus sincitial respiratorio, virus vivo modificado.

**Ejemplo 11: Protocolo de ensayo de potencia para vacunas por fiebre del embarque**

55 En la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos, pendiente de tramitación junto con la presente, número 61/427.404, titulada "Compositions and Methods for Identifying and Differentiating Viral Components of Multivalent Shipping Fever Vaccines" (presentadas al mismo tiempo el 27 de diciembre de 2010, e incorporadas específicamente en el presente documento en su totalidad por referencia expresa a la misma), los presentes  
60 inventores informaron sobre el desarrollo de un protocolo de ensayo genético modificado útil para obtener la cuantificación viral directa (es decir, la "potencia") de cada componente viral individual en una vacuna multivalente. La invención reemplaza los ensayos de FA/IFA convencionales (como los descritos en el ensayo SAM 101 actual) con un ensayo RT-qPCR para determinar la presencia o ausencia de especies, tipos o subtipos de virus particulares en los pozos de ensayo individuales (es decir, diluciones).

65

Las pruebas de potencia para los componentes individuales de una vacuna multivalente, como la vacuna de MLV hexavalente descrita en el presente documento también se pueden hacer más objetiva sustituyendo el análisis RT-qPCR/qPCR de los pozos individuales para la observación visual de CPE. Por ejemplo, la observación de CPE en los ensayos de titulación viral puede ser bastante subjetiva y, a menudo, se considera que es la fuente de diferencias en los títulos de vacunas de MLV entre las instalaciones de prueba. Sin embargo, al aumentar la objetividad del ensayo, la reproducibilidad entre laboratorios también debería aumentar.

La prueba de potencia para PI<sub>3</sub> se puede realizar utilizando un procedimiento de ensayo suplementario modificado para la valoración de vacunas contra el virus de la parainfluenza 3 (MVSAM102.01). La prueba de potencia para el BRSV se puede realizar utilizando un procedimiento de ensayo suplementario modificado para la valoración del virus sincitial respiratorio bovino en vacunas (MVSAM0129.01). Estos ensayos se modifican sustituyendo el análisis de qPCR en tiempo real de los pozos individuales para la observación visual del CPE. La valoración de la fracción de BHV se realiza utilizando un procedimiento de ensayo suplementario modificado para la valoración del virus infeccioso de la rinotraqueitis bovina en vacunas (MVSAM0105.01). En este ensayo, se puede utilizar un formato de 96 pozos en lugar del formato estándar de 6 pozos, para estandarizar los ensayos para el análisis de vacunas multivalentes. Es importante destacar que este protocolo incluye la sustitución del análisis de qPCR de los pozos individuales para la observación visual y el recuento de las placas de BHV para proporcionar un ensayo más preciso y robusto.

El presente ejemplo demuestra el uso de las técnicas cuantitativas (en tiempo real) de la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR) expuestas en la solicitud de patente provisional de Estados Unidos pendiente junto con la presente de los inventores No. 61/427.404, para determinar con éxito la potencia de cada uno de los seis componentes virales individuales de la vacuna de MLV hexavalente descrita en el presente documento. Los inventores muestran que el ensayo es particularmente ventajoso sobre las metodologías existentes para determinar las potencias individuales de cepas relacionadas genéticamente en un ejemplo multivalente. Utilizando la vacuna contra BRDC de MLV hexavalente como modelo, se demuestra que el ensayo cuantifica eficazmente las potencias individuales de los tres subgenotipos genéticos de BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV-2 contenidos en ellos.

## **Materiales y procedimientos**

### **Cultivo de celular**

Todos los cultivos se preparan utilizando técnicas y suministros convencionales, como lo describe Freshney (1987). La línea celular de riñón bovino TVL, que exhibe un epitelio típico como la morfología en cultivo, se usa para todos los ensayos de cultivo.

### **Especificidad de los grupos de cebador/sonda**

El ARN se extrae de los fluidos virales de cada una de las siguientes semillas virales aprobadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA): BVDV-1a (cepa Singer), BVDV-1b (cepa TGAC), BVDV-2 (125), PI<sub>3</sub> (Reisinger SF-4) y BRSV (N375) (no se realiza ningún proceso de extracción en BHV-1 [cepa Cooper] ya que es un virus de ADN). Las extracciones se realizan utilizando RNAqueous®-4PCR (Ambion; Austin, TX, EE.UU.).

Cada una de las muestras de ARN viral se usa como plantilla (muestra) en reacciones de RT-qPCR separadas para cada uno de los seis grupos de cebador/sonda que utilizan Química TaqMan® para RT-PCR de una etapa. El virus de ADN (BHV-1) también se usa como plantilla (muestra) en reacciones de qPCR separadas con cada uno de los seis grupos de cebador/sonda descritos anteriormente. El análisis del grupo de cebador/sonda para BRSV contra las seis fracciones virales de la vacuna hexavalente indica que no hay reactividad cruzada para cada uno de los grupos de cebador/sonda con cualquiera de las otras fracciones virales.

### **Ensayos de qPCR**

Los ensayos de qPCR se llevan a cabo utilizando un sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500.

### **Cebadores de oligonucleótidos y sondas moleculares marcadas**

Las siguientes sondas TaqMan® personalizadas y los pares de cebadores directo e inverso específicos del virus fueron fabricados por Applied Biosystems (Foster City, CA, EE.UU.).

#### **BVDV-1b (primero):**

Cebador directo: 5'-CACCTATCAGGCTGTATTCATAGC-3' (SEQ ID NO: 1);

Cebador inverso: 5'-TGCCACAGCACATCTTAACC-3' (SEQ ID NO: 2); y

Sonda TaqMan® MGB para BVDV-1b: 5'-TCACCTGGACGACCC-3' (SEQ ID NO: 3).

#### **BVDV-1b (segundo):**

Segundo cebador directo: 5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 19);  
 Segundo cebador inverso: 5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 20); y  
 Segunda sonda de detección para BVDV-1b: 5'-GTCGTCCAGGTGAAAACGGT-3' (SEQ ID NO: 21).

5

**BRSV:**

Cebador directo: 5'-GCAATGCTGCAGGACTAGGTATAAT-3' (SEQ ID NO: 4);  
 Cebador inverso: 5'-ACACTGTAATTGATGACCCCATCT-3' (SEQ ID NO: 5); y  
 Sonda BRSV TaqMan® MGB: 5'-AAGACTTGTATGATGCTGCCAA-3' (SEQ ID NO: 6).

10

**BVDV-1a:**

Cebador directo: 5'-GGTCGCCAGGTAAAAGCA-3' (SEQ ID NO: 7);  
 Cebador inverso: 5'-GCCTCTGCAGCACCTATCA-3' (SEQ ID NO: 8); y  
 Sonda TaqMan® MGB para BVDV-1a: 5'-AACCGACTGTTACGAATAC-3' (SEQ ID NO: 9).

15

**BVDV-2:**

Cebador directo: 5'-GCTAGCCATGCCCTTAGTAGGAC-3' (SEQ ID NO: 10);  
 Cebador inverso: 5'-GACGAGTCCCCTGTACTCAGG-3' (SEQ ID NO: 11); y  
 Sonda TaqMan® MGB para BVDV-2: 5'-CAGTGAGTCCATTGGATGG-3' (SEQ ID NO: 12).

20

**PI<sub>3</sub>:**

Cebador directo: 5'-GGAGACCAAGACCAAGGAGATG-3' (SEQ ID NO: 13);  
 Cebador inverso: 5'-CGTCTGCCCATGCATAAGG-3' (SEQ ID NO: 14); y  
 Sonda TaqMan® MGB para PI<sub>3</sub>: 5'-ACCTCGGTCATCCATAG-3' (SEQ ID NO: 15).

25

**BHV-1:**

Cebador directo: 5'-CCATGTTAGCGCTCTGGAACC-3' (SEQ ID NO: 16);  
 Cebador inverso: 5'-CGTCTTTACGGTCGACGACTCC-3' (SEQ ID NO: 17); y  
 Sonda TaqMan® MGB para BHV-1: 5'-ACGGACGTGCGCGAA-3' (SEQ ID NO: 18).

30

35

**Ensayo de potencia para vacunas monovalentes**

Los protocolos para cada uno de los siguientes ensayos utilizan la metodología del ciclo de umbral comparativo ( $C_T$ ) de Applied Biosystems 7500 para determinar si un pozo individual de una placa de titulación contiene una cantidad mayor de virus que el pozo de referencia equivalente. La mayoría de las muestras virales contienen algunas partículas virales no viables que podrían ser detectadas por el ensayo de PCR, dando así resultados potencialmente falsos positivos. Este problema se resuelve mediante el uso de una placa de referencia sin células. La muestra se diluye en la placa de referencia exactamente como está en la placa de ensayo pero sin células para eliminar la posibilidad de replicación viral. La placa de referencia se utiliza para generar un valor  $C_T$  de línea base o fondo para cada uno de los pozos en cada ensayo. Si un pozo en la placa de ensayo tiene un valor de  $C_T$  más alto que el pozo de fondo correspondiente, se ha producido una replicación viral y el pozo se considera positivo. Si no se determina un valor  $C_T$  para un pozo, o si el valor  $C_T$  es equivalente al valor  $C_T$  de fondo, entonces el pozo se considera negativo.

40

45

**Ensayo de potencia para vacunas multivalentes**

Se preparó una serie piloto de la vacuna hexavalente IBR/BVDV-1a, IBR/BVDV-1b, IBR/BVDV-2/PI<sub>3</sub>/RSV, virus vivo modificado, como se describe en el presente documento. Brevemente, se propagaron BHV-1 (cepa Cooper), BVDV-1a (cepa Singer), BVDV-1b (cepa TGAC), BVDV-2 (125), PI<sub>3</sub> (Reisinger SF-4) y BRSV (N375) en la línea celular TVL-BK (vigésimo pase). Las fracciones individuales se recolectaron en el décimo pase y se combinaron en el producto de seis vías. Se puede realizar una prueba de potencia para cada fracción de la vacuna de 6 vías como se describe en este documento con la adición de antisueros neutralizantes apropiados. El TCID<sub>50</sub> de cada fracción viral se determina en función de los resultados de CPE/FA/IFA y se compara con los basados en RT-qPCR/qPCR.

50

55

**Pruebas de potencia de BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV-2**

Las muestras de BVDV-1a, BVDV-1b y BVDV-2 monovalentes se pueden valorar por separado de acuerdo con el procedimiento de ensayo suplementario para la valoración del virus de la diarrea viral bovina en la vacuna (SAM 101). Brevemente, el ensayo se realiza por duplicado con una de las placas que se utiliza para el cálculo del título en función del CPE y/o FA/IFA como se describió. La otra placa se utiliza para determinar un título basado en RT-

60

qPCR. Se incluye una placa de referencia deficiente en células como se describió anteriormente para cada uno de los virus.

#### Prueba de potencia de PI<sub>3</sub>

La prueba de potencia para PI<sub>3</sub> se realiza por duplicado con una de las placas que se utiliza para el cálculo del título basado en el CPE. La otra placa se utiliza para determinar un título basado en los valores de C<sub>T</sub> comparativos de PI<sub>3</sub> de acuerdo a lo determinado por RT-qPCR. Una placa de referencia deficiente en células se incluye como se describió anteriormente.

#### Prueba de potencia de BRSV

La prueba de potencia para BRSV se realiza por duplicado con una de las placas que se utiliza para el cálculo del título basado en el CPE como se describió anteriormente, usando la placa restante para determinar un título con base en los valores C<sub>T</sub> comparativos de BRSV de acuerdo a lo determinado por RT qPCR. Como se discutió anteriormente, una placa de referencia deficiente en células también se incluye en el ensayo.

#### Prueba de potencia de BHV

La prueba de potencia para BHV se lleva a cabo en un formato de 96 pozos, sustituyendo el análisis de qPCR de pozos individuales por observación visual convencional y el recuento de las placas. El ensayo se realiza por duplicado, y una de las placas se utiliza para el cálculo del título en función de la presencia o ausencia de CPE en un pozo individual (dilución), mientras que la placa restante se utiliza para calcular un título en función de los valores C<sub>T</sub> comparativos de BHV como se determina por qPCR. Una placa de referencia deficiente en células se incluye como se describió anteriormente.

#### Referencias

Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan ejemplos de procedimiento u otros detalles complementarios a los que se exponen en el presente documento, se incorporan específicamente en este documento en su totalidad por referencia expresa a las mismas:

- Patente de Estados Unidos No. 4.415.732 de Caruthers et al.  
 Patente de Estados Unidos No. 4.458.066 de Caruthers et al.  
 Patente de Estados Unidos No. 4.683.195 de Mullis et al.  
 Patente de Estados Unidos No. 4.683.202 de Mullis et al.  
 Patente de Estados Unidos No. 4.725.677 de Koster et al.  
 Patente de Estados Unidos No. 4.973.679 de Caruthers et al.  
 Patente de Estados Unidos No. 4.980.460 de Molko et al.  
 Patente de Estados Unidos No. 5.614.388 de Picone et al.  
 Agrawal et al., Nucl. Acids Res., 18:5419-5423, 1990  
 Baker, J.C., "The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection," Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract., 11: 425-445, 1995.  
 Baker, J.C., Werdin, R.E., Ames, T.R., Markham, R.J., y Larson, V.L., "Study on the etiologic role of bovine respiratory syncytial virus in pneumonia of dairy calves," J. Am. Vet. Med. Assoc., 189(1): 66-70, 1986.  
 Barber, D.M., Nettleton, P.F., y Herring, J.A., "Disease in a dairy herd associated with the introduction and spread of bovine diarrhoea virus," Vet. Rec., 117(18): 459-464, 1985.  
 Beaucage y Iyer, Tetrahedron, 48: 2223-2311, 1992.  
 Becher, P., König, M., Paton, D.J., y Thiel, H.J., "Further characterization of border disease virus isolates: evidence for the presence of more than three species within the genus pestivirus," Virology, 209(1): 200-206, 1995.  
 Collett, M.S., R. Larson, S.K. Belzer, y E. Retzel, "Proteins encoded by bovine viral diarrhoea virus: the genomic organization of a pestivirus," Virology, 165(1): 200-208, 1988.  
 Elbers, K., N. Tautz, P. Becher, D. Stoll, T. Rumenapf, y H.J. Thiel, "Processing in the pestivirus E2-NS2 region: identification of proteins p7 and E2p7," J. Virol., 70(6): 4131-4135, 1996.  
 Fergen, B.J., "Estimating an Intervention Effect on Outcome Severity," USDA Center for Veterinary Biologics, Ames, IA, USA; Personal communication, 2004 .  
 Finney, D.J., "Statistical method in biological assay," 3e Ed., Charles Griffin and Company Ltd., London, 1978.  
 Flores, E.F., Ridpath, J.F., Weiblen, R. et al., "Phylogenetic analysis of Brazilian bovine viral diarrhoea virus type 2 (BVDV-2) isolates: evidence of subgenotype within BVDV-2," Virus Res., 87: 51-60, 2002.  
 Freshney, R.I., "Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique," Second Edition, Dept of Medical Oncology, University of Glasgow, Alan R. Liss, Inc., Publisher, New York, NY, EE. UU., 1987.  
 Fulton, R.W., Hessmand, B, Johnson, B.J. et al. "Evaluation of diagnostic test used for detection of bovine viral diarrhoea virus and prevalence of subtypes 1a, 1b and 2a in persistently infected cattle entering a feedlot," J. Am. Vet. Med. Assoc., 228(4): 578-584, 2006.



- Gillespie, J.H., J.A. Baker, y K. McEntee, "A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus," *Cornell Vet.*, 50:73-79, 1960.
- Hofmann, M.A., Brechtbuhl, K., y Stauber, N., "Rapid characterization of new pestivirus strains by direct sequencing of PCR-amplified cADN from the 5' non-coding region," *Arch. Virol.*, 139: 217-229, 1994.
- 5 Holland et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 88: 7276-7280, 1991.
- Liess, B., H.R. Frey, H. Kittsteiner, F. Baumann, y W. Neumann, "Bovine mucosal disease, an immunobiological explainable late stage of BVD-MD virus infection with criteria of a 'slow virus infection,'" *Dtsch. Tieraerztl. Wschr.*, 81(2): 481-487, 1974.
- Malmquist, W.A., "Bovine viral diarrhea mucosal disease: etiology, pathogenesis, and applied immunity," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 152: 763-768, 1968.
- 10 McNulty M.S., Allan G.M., "Application of immunofluorescence in veterinary viral diagnosis," En: *Recent advances in virus diagnosis*, McNulty MS, McFerran JB (Eds.), pp. 15-26. Martinus Nijhoff, The Hague, Netherlands, 1984.
- Olafson, P., A.D., MacCallum, y F.H. Fox, "An apparently new transmissible disease of cattle," *Cornell Vet.*, 36: 205-213, 1946.
- 15 Ozaki et al., *Nucl. Acids Res.*, 20: 5205-5214, 1992 .
- Paton, D.J., "Pestivirus diversity," *J. Comp. Pathol.*, 112(3): 215-236, 1995.
- Pellerin, C., J. van den Hurk, J. Lecomte, y P. Tussen, "Identification of a new group of bovine viral diarrhea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities," *Virology*, 203(2): 260-268, 1994.
- 20 Ramsey, F.K., y W.H. Chivers, "Mucosal disease of cattle," *North Am. Vet.*, 34: 629-633, 1953.
- Ranheim, T, Mathis, P.K., Joelsson, D.B. et al., "Development and application of a quantitative RT-PCR potency assay for a pentavalent rotavirus vaccine (Rota Teq®)," *J. Virol. Meth.*, 131: 193-201, 2006.
- Ridpath, J.F., y Bolin, S.R., "Differentiation of types 1a, 1b, and 2 bovine virus diarrhea virus by PCR," *Molec. Cell. Probes*, 12: 101-106, 1998.
- 25 Ridpath, J.F., S.R. Bolin, y E.J. Dubovi, "Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes," *Virology*, 205(1): 66-74, 1994.
- Ridpath, J.F., Bolin, S.R., y Dubovi, E.J., "Segregation of bovine viral diarrhea virus into genotypes," *Virology*, 205: 66-74, 1994.
- Ross, C.E., Dubovi, E.J., y Donis, R.O., "Herd problems of abortions and malformed calves attributed to bovine viral diarrhea," *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 188(6): 618-619, 1986.
- 30 Sambrook et al., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU., 1989.
- Sambrook y Russell, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, EE. UU., 2001.
- 35 Schalk, J.A.C., de Vries, C.G.J.C.A., y Jongen, P.M.J.M., "Potency estimation of measles, mumps and rubella trivalent vaccines with quantitative PCR infectivity assay," *Biologicals*, 33(2): 71-79, 2005.
- Schalk, J.A.C., Elzen ,C.V.D., Ovelgonne, H, et al., "Estimation of the number of infectious measles viruses in live virus vaccines using quantitative real-time PCR," *J. Virol. Meth.*, 117: 179-187, 2004.
- Schefers, J., Munoz-Zanzi, C., Collins, J.E., Goyal, S.M., y Ames, T.R., "Serological evaluation of precolostral serum samples to detect Bovine viral diarrhea virus infections in large commercial dairy herds," *J. Vet. Diagn. Invest.*, 20: 625-628, 2008.
- 40 Tanner, J.E., y A. P. Morgan, "Design and analysis of veterinary vaccine efficacy trials," *Vet. Microbiol.*, 37(3-4): 221-230, 1993.
- Tautz, N., Elbers, K., Stoll, D., Meyers, G., y Thiel, H.J., "Serine protease of pestiviruses: determination of cleavage sites," *J. Virol.*, 71(7): 5415-5422, 1997.
- 45 Thiel et al., "The pestiviruses," In *Virology*, Fields et al., (eds.) (Lippincott-Raven, Philadelphia, PA, USA), pp.1059-1073, 1996.
- Vilcek, S, Paton, D.J., Durkovic, B, et al. "Bovine viral diarrhea virus genotype 1 can be separated into at least eleven genetic groups." *Arch. Virol.*, 146: 99-115, 2001.
- 50 Wang, F, Puddy, A.C., Mathis, B.C., et al., "Using QPCR to assign infectious potencies to adenovirus based vaccines and vectors for gene therapy: toward a universal method for the facile quantitation of virus and vector potency," *Vaccine*, 23:4500-4508, 2005.
- Wiskerchen, M., y M.S. Collett, "Pestivirus gene expression: protein p80 of bovine viral diarrhea virus is a proteinase involved in polyprotein processing," *Virology*, 184(1): 341-350, 1991.
- 55 Wren, G., "New Thinking on BRSV: Research into BRSV and vaccines reveals new information about how the virus behaves and how it may interact with killed vaccines," *Bovine Veterinarian*, (Febrero) página 16-19, 2001.
- Xu, J., E. Mendez, P.R. Caron, C. Lin, M.A. Murcko, M.S. Collett, y C.M. Rice, "Bovine viral diarrhea virus NS3 serine proteinase: polyprotein cleavage sites, cofactor requirements, and molecular model of an enzyme essential for pestivirus replication," *J. Virol.*, 71(7): 5312-5322, 1997.
- 60 Xue, W., D. Mattick, L. Smith, J. Umbaugh, y E. Trigo, "Vaccination with a modified-live bovine viral diarrhea virus (BVDV) type 1a vaccine completely protected calves against challenge with BVDV type 1 b strains," *Vaccine*, 29(1): 70-76, Dic. 10, 2010, [epub ya disponible Oct. 27, 2010].
- 65

**Listado de secuencias**

<110> Eli Lilly and Company  
Weise, Dale W  
Harris, James R

- 5 <120> COMPOSICIONES DE VACUNA CONTRA EL VIRUS DE LA DIARREA VIRAL BOVINA TIPO 1B Y PROCEDIMIENTOS  
<130> X19557
- 10 <150> 61/427361  
<151> 2010-12-27  
<160> 21
- 15 <170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 25  
<212> ADN  
20 <213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> constructo sintético - cebador
- 25 <400> 1  
caccctatca ggctgtattc atagc 25  
<210> 2  
<211> 21  
30 <212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
<223> constructo sintético - cebador
- 35 <400> 2  
tgcccacagc acatcttaac c 21  
<210> 3  
40 <211> 15  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial  
<220>  
45 <223> constructo sintético - cebador  
<400> 3  
tcacctggac gacctc 15
- 50 <210> 4  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 55 <220>  
<223> constructo sintético - cebador  
<400> 4  
60 gcaatgctgc aggactaggt ataata 25  
<210> 5  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia Artificial
- 65 <220>

<223> constructo sintético - cebador  
 <400> 5  
 5 acactgtaat tgatgacccc attct 25  
 <210> 6  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 <400> 6  
 15 aagacttgta tgatgctgcc aa 22  
 <210> 7  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 <400> 7  
 25 ggtcgcccag gtaaaagca 19  
 <210> 8  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 30 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 <400> 8  
 35 gcctctgcag caccctatca 20  
 <210> 9  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 <400> 9  
 45 aaccgactgt tacgaatac 19  
 <210> 10  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 <400> 10  
 60 gctagccatg cccttagtag gac 23  
 <210> 11  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 65

<223> constructo sintético - cebador  
 <400> 11  
 5 gacgagtcctc ctgtactcag g 21  
 <210> 12  
 <211> 19  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 <400> 12  
 15 cagtgagtcc attggatgg 19  
 <210> 13  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 25 <400> 13  
 ggagaccaag accaaggaga tg 22  
 <210> 14  
 <211> 19  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 35 <400> 14  
 cgtctgccca tgcataagg 19  
 <210> 15  
 40 <211> 17  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> constructo sintético - cebador  
 <400> 15  
 acctcgtca tccatag 17  
 50 <210> 16  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 55 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 <400> 16  
 60 ccatgttagc gctctggaac c 21  
 <210> 17  
 <211> 22  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 65 <220>

<223> constructo sintético - cebador  
 <400> 17  
 5 cgtctttacg gtcgacgact cc 22  
 <210> 18  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 10 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 <400> 18  
 15 acggacgtgc gcgaa 15  
 <210> 19  
 <211> 20  
 <212> ADN  
 20 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 25 <400> 19  
 gtcgtccagg tgaaaacggt 20  
 <210> 20  
 <211> 20  
 30 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 <223> constructo sintético - cebador  
 35 <400> 20  
 gtcgtccagg tgaaaacggt 20  
 <210> 21  
 40 <211> 20  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia Artificial  
 <220>  
 45 <223> constructo sintético - cebador  
 <400> 21  
 gtcgtccagg tgaaaacggt 20

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición inmunogénica que comprende: un virus de la diarrea viral bovina de tipo 1b (BVDV1b), atenuado, vivo, modificado, en la que el BVDV1b vivo, modificado es una cepa depositada bajo el número de acceso de la ATCC PTA-11553.
- 10 2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende además una cantidad inmunológicamente eficaz de al menos un antígeno adicional.
- 15 3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en la que al menos un antígeno adicional es específico para un organismo seleccionado del grupo que consiste en *Actinobacillus*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Bordetella*, *Brachyspira*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Ehrlichia*, *Erysipelothrix*, *Escherichia*, *Histophilus*, *Leptospira*, *Listeria*, *Mannheimia*, *Moraxella*, *Mycobacterium*, *Mycoplasma*, *Pasteurella*, *Salmonella* y *Streptococcus*, o una combinación de los mismos.
- 20 4. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en la que al menos un antígeno adicional está inactivado.
- 25 5. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende además uno o más de:  
 un virus de parainfluenza tipo 3 (PI<sub>3</sub>), vivo modificado,  
 un virus sincitial respiratorio bovino (BRSV) vivo, modificado,  
 un virus del herpes bovino (BHV-1) vivo, modificado,  
 un virus de la diarrea viral bovina, tipo 1a (BVDV1a), vivo, modificado, o  
 un virus de la diarrea viral bovina, tipo 2 (BVDV2) vivo, modificado.
- 30 6. Una vacuna que comprende una cantidad profilácticamente eficaz de la composición inmunogénica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, y un adyuvante.
- 35 7. La vacuna de la reivindicación 6, que comprende además una cantidad inmunológicamente eficaz de al menos un antígeno específico de un patógeno microbiano.
8. Una cantidad profilácticamente eficaz de una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en la prevención de la fiebre del embarque, el complejo de enfermedad respiratoria bovina o la diarrea viral bovina, en un animal.
- 40 9. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que el animal está infectado por, o es susceptible a la infección de, un Pestivirus.
- 45 10. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 8 o la reivindicación 9, en la que el animal es un bóvido.
11. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la reivindicación 1 y un adyuvante; en la que la composición inmunogénica comprende al menos  $2 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> del BVDV1b vivo, modificado por dosis.
- 50 12. La vacuna de la reivindicación 11, que comprende además uno o más de:  
 al menos  $5 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> de un BHV-1 vivo, modificado por dosis;  
 al menos  $5 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> de un BVDV1a vivo, modificado por dosis;  
 al menos  $3 \times 10^3$  TCID<sub>50</sub> de un BVDV2 vivo, modificado por dosis;  
 al menos  $6 \times 10^4$  TCID<sub>50</sub> de un PI<sub>3</sub> vivo, modificado por dosis; y  
 al menos  $7 \times 10^2$  TCID<sub>50</sub> de un BRSV vivo, modificado por dosis.