

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 759 583**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61K 39/112 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.10.2013 PCT/EP2013/072358**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.05.2014 WO14064236**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.10.2013 E 13783051 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2019 EP 2911688**

54 Título: **Vacunas de Salmonella de protección cruzada**

30 Prioridad:

26.10.2012 EP 12190173

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

11.05.2020

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

Wim de Körverstraat 35

5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

PUGH, CHRISTOPHER

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones:

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

ES 2 759 583 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vacunas de Salmonella de protección cruzada

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a la protección cruzada de serovares de *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 con serovares de *Salmonella enterica* del serogrupo C1, lo que permite la fabricación de vacunas que comprenden un serovar de solo uno de estos dos serogrupos distintos para proteger contra cualquiera de los serogrupos de *Salmonella enterica*.

Antecedentes

La *Salmonella* es un importante patógeno de las aves de corral, y su presencia en explotaciones avícolas es una preocupación importante para la salud pública humana. Los incidentes de intoxicación alimentaria causados por *Salmonella* siguen siendo frecuentes en todo el mundo, y solo superan a *Campylobacter* como la causa más común de intoxicación alimentaria debido a bacterias. No es sorprendente, que los productos avícolas sean una fuente primaria de infecciones por *Salmonella* en seres humanos, con la transferencia de este patógeno que se origina ya sea de gallinas ponedoras a huevos, o de canales de pollos de engorde a productos cárnicos. La *Salmonella* Enteritidis (SE) es especialmente importante en la intoxicación alimentaria asociada al huevo debido a la capacidad de algunas cepas de colonizar los tejidos reproductivos de las gallinas, lo que puede dar como resultado la presencia de *Salmonella* viva en los huevos y/o en la cáscara del huevo.

La contaminación por *Salmonella* puede controlarse hasta cierto punto mediante el uso de medidas eficaces de bioseguridad, productos de exclusión competitiva y procedimientos de desinfección. Estas medidas se usan junto con la vacunación para proporcionar la protección óptima contra la contaminación de un grupo de aves de corral, siendo la vacunación una ayuda eficaz para reducir la contaminación de los huevos por SE. De hecho, desde la introducción de las vacunas en los programas de control de *Salmonella* en la década de 1990, su uso se ha generalizado en muchas partes del mundo.

Las vacunas inactivadas NOBILIS SALENVAC® y SALENVAC T®, que se introdujeron primero, han sido reemplazadas casi por completo en el mercado de productores de huevos por vacunas vivas, debido a la protección temprana que ofrece y a un coste reducido, particularmente en el trabajo, ya que la administración se puede lograr a través del agua potable. Por lo tanto, dentro de la porción productora de huevos de la industria avícola, la vacunación con una vacuna viva de *Salmonella* durante la primera semana de vida se ha convertido en una práctica convencional en el Reino Unido y se está volviendo más común en toda la Unión Europea. Mientras que se dice que la vacunación repetida ofrece protección a las gallinas a lo largo de la vida del grupo, muchos productores siguen un programa inicial de vacunación viva con una dosis o el curso de una vacuna inactivada. La base de este último procedimiento es que se ha demostrado que los anticuerpos presentes en las yemas de los huevos puestos por gallinas que habían sido vacunadas con una vacuna inactivada reducen el crecimiento de *Salmonella* en comparación con los de las gallinas no vacunadas o las gallinas vacunadas con una vacuna viva. Las vacunas inactivadas también siguen siendo una práctica común en la industria de la carne de aves de corral, ya que proporcionan protección pasiva a los pollitos recién nacidos contra *Salmonella* mediante la transferencia de anticuerpos a través del huevo [Inoue et al. Avian Diseases 52:567-571 (2008)].

Salmonella spp. es un género bacteriano gramnegativo que se divide en dos especies, *S. enterica* y *S. bongori*. *S. enterica* contiene 6 serogrupos principales (A, B, C1, C2-3, D y E) que se han clasificado de acuerdo con su estructura de lipopolisacárido. Esencialmente, todas las vacunas existentes en el mercado reivindican que protegen contra *Salmonellae* de los serogrupos B (es decir, serovar *S. Typhimurium*) y D (es decir, serovar *S. Enteritidis*) y, por lo tanto, se dirigen específicamente a la reducción de estos serovares. De hecho, hasta hace poco, estos serogrupos no solo eran los más prevalentes, sino también los más importantes desde el punto de vista zoonótico. Sin embargo, aunque *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* siguen siendo los serovares más comunes implicados en enfermedades humanas en Europa, su prevalencia en productos de pollo contaminados parece estar disminuyendo, mientras que *Salmonellae* de los serogrupos C1 (que incluye, por ejemplo, *S. Infantis*, *S. Mbandaka*, y *S. Virchow*) y C2-3 (que incluye, por ejemplo, *S. Hadar*, *S. Newport* y *S. Kentucky*) han aumentado significativamente en prevalencia. De forma destacable, se ha demostrado que una vacuna que comprende los serovares *S. Typhimurium* (serogrupo B) y *S. Enteritidis* (serogrupo D) proporciona protección cruzada contra otros serovares del serogrupo B, es decir, *S. Heidelberg* y *S. Agona*, pero no pudo muestra ninguna eficacia contra una exposición a *S. Hadar* (serogrupo C2-3), lo que indica la necesidad de antígenos adicionales en las vacunas para proporcionar la protección necesaria.

Más recientemente, se ha informado que una vacuna trivalente inactivada que contiene *S. Enteritidis* (serogrupo D), *S. Typhimurium* (serogrupo B) y *S. Infantis* (serogrupo C1) es eficaz contra una exposición a *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, o *S. Heidelberg* (serogrupo B) [Deguchi et al., Avian Disease 53:281-286 (2009)]. Por consiguiente, Deguchi describe una protección homóloga, y no desvela ni sugiere ninguna protección cruzada entre los grupos C1 y C2-3.

Además, otra vacuna trivalente inactivada que contiene *S. Typhimurium* (serogrupo B), *S. Mbandaka* (serogrupo C1) y *S. Orion* (serogrupo E) también se ha informado que protege contra varios serovares de los serogrupos B y C1, aunque los resultados con los serovares del serogrupo E no fueron concluyentes [Pavic et al., Avian Pathology 39 (1):31-39 (2010)]. Como la vacuna protege contra *S.e* de los serovares B y C, por consiguiente, esto se refiere a la protección homóloga. Por lo tanto, no se desvela ni sugiere protección cruzada entre los grupos C1 y C2-3.

El antígeno O es un componente importante de lipopolisacárido de la superficie celular de todas las bacterias Gramnegativas. Cada uno de los serogrupos de *S. enterica* expresa antígenos O distinguibles y, en consecuencia, el antígeno O puede usarse en su clasificación [Nori y Thong, African Journal of Microbiology Research 4(9) 871-876 (2010)]. Consecuentemente, se encontró poca o ninguna reacción cruzada entre los seis serogrupos de *S. enterica* diferentes cuando se realizó un ensayo inmunosorbente ligado a enzimas (ELISA) [Smith et al., J. Vet. Diagn. Invest., 7:481-487 (1995)].

El antígeno O está codificado por múltiples genes en el grupo de genes *rfb* del genoma de *S. enterica* y, no es sorprendente que, existan diferencias significativas dentro de los grupos de genes *rfb* entre los 6 serogrupos principales de *S. enterica* [Lee et al., J. Gen. Microbiol., 138:1843-1855 (1992); Nori y Thong, African Journal of Microbiology Research 4(9) 871-876 (2010)]. Más particularmente, se ha demostrado que el grupo de genes *rfb* del serogrupo C1 tiene una similitud limitada con el grupo *rfb* de los serogrupos A, B, C2-3, D, o E [Lee et al., J. Gen. Microbiol., 138:1843-1855 (1992)]. Además, un anticuerpo monoclonal producido contra un serovar del serogrupo C2-3 extraído con alcohol y acetona calentada (*S. Newport*) reaccionó con lipopolisacáridos libres de proteínas de otros serovares del serogrupo C2-3, pero no con lipopolisacáridos libres de proteínas de cualquier otro serogrupo. Además, la reactividad con este anticuerpo monoclonal se inhibió mediante la incubación previa del antígeno correspondiente del serogrupo C2-3 con anticuerpos policlonales de conejo antiserogrupo C2-C3, pero no mediante la incubación previa de ese antígeno con antisueros policlonales obtenidos del antígeno del serogrupo C1, o cualquier otro antígeno de serogrupo de *Salmonella* probado [Duffey et al., J. Clin. Microbiol. 30(12):3050-3057 (1992)].

Aunque las vacunas contra serogrupos específicos de *Salmonella* han estado disponibles comercialmente durante varias décadas, sigue existiendo una necesidad de proporcionar vacunas de *Salmonella* que puedan proteger contra los serogrupos C1 y C2-3 de *Salmonella*, así como contra los serogrupos B y D.

La cita de cualquier referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que dicha referencia está disponible como "técnica anterior" para la presente solicitud.

Sumario de la invención

Para superar las deficiencias de las vacunas actuales contra *Salmonella*, un aspecto de la presente invención proporciona un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 para su uso en la protección de aves de corral contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3, o una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 y *Salmonella enterica* del serogrupo C1. De manera análoga, la presente invención desvela el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 en la fabricación de una vacuna para la administración a aves de corral para proteger contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3, o una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 y *Salmonella enterica* del serogrupo C1. En realizaciones específicas, la vacuna *Salmonella enterica* C1 es para administración a pollos.

En una realización particular, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 es *S. Livingstone*. En otra realización, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 es *S. Mbandaka*. En otra realización más, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 es *S. Montevideo*. En aún otra realización, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 es *S. Ohio*. En otra realización más, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 es *S. Thompson*. En aún otra realización, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 es *S. Virchow*. En una realización específica, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 es *S. Infantis*.

En una realización particular, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 es *S. Blockley*. En otra realización, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 es *S. Bovismorbificans*. En otra realización más, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 es *S. Kentucky*. En aún otra realización, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 es *S. Kottbus*. En otra realización más, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 es *S. Muenchen*. En aún otra realización, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 es *S. Newport*. En una realización específica, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 es *S. Hadar*.

La presente invención también proporciona el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 en combinación con un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo B para protección adicional de aves de corral contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo B. De manera análoga, la presente invención desvela además el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 en la fabricación de una vacuna de la presente invención que incluye además el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo B. En una realización específica, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo B es *S. Typhimurium*. En otras realizaciones, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo B puede ser *S. Agama*, *S. Agona*, *S. Derby*, *S. Heidelberg*, *S. Indiana*, *S. Saintpaul*, *S. Sarajane*, o *S. Monophasic Typhimurium*.

La presente invención también desvela el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 en combinación con un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo D para protección adicional de aves de corral contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo D. De manera análoga, la presente invención desvela además el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 en la fabricación de una vacuna de la presente invención que incluye además el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo D. En una realización específica, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo D es *Salmonella* Enteritidis. En otra realización de este tipo, el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo D es *S. Pullorum/Gallinarum*.

La presente invención también desvela el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 en combinación con un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo B y un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo D para protección adicional de las aves de corral contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo B y *Salmonella enterica* del serogrupo D. De manera análoga, la presente invención también desvela el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 en la fabricación de una vacuna de la presente invención que incluye además el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo B y un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo D. En una realización específica de este tipo, la presente invención proporciona el uso de serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium e Infantis, incluida la fabricación de una vacuna, para la protección de aves de corral contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* de los serogrupos C1, C2-C3, B y D. En otra realización de este tipo, la presente invención desvela el uso de serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium y Hadar, incluida la fabricación de una vacuna, para la protección de aves de corral contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* de los serogrupos C1, C2-C3, B y D.

La presente invención desvela además el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 o un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 de la presente invención, incluida la fabricación de una vacuna, que incluye además el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo G (por ejemplo, *S. Durham*, *S. Kedougou*, *S. Mishmarhaemek*, o *S. Poona*), un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo E1 (por ejemplo, *S. Anatum*, *S. Binza*, *S. Orion*, o *S. Thomasville*), o un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo E4 (por ejemplo, *S. Senftenberg*).

Todos los serovares de *Salmonella enterica* utilizados por la presente invención, incluidos aquellos en la fabricación de vacunas, se pueden cultivar en un medio con restricción de hierro, dando como resultado células con restricción de hierro. En determinadas realizaciones, los serovares de *Salmonella enterica* están inactivados. En una realización particular de la presente invención, los serovares de *Salmonella enterica* y/o la vacuna correspondiente fabricada, es una suspensión líquida de células con restricción de hierro e inactivadas con formalina de serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium, e Infantis. En otra realización particular de la presente invención, los serovares de *Salmonella enterica* y/o la vacuna correspondiente fabricada, es una suspensión líquida de células con restricción de hierro e inactivadas con formalina de serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium, y Hadar. En determinadas realizaciones, los serovares de *Salmonella enterica* están vivos. En realizaciones específicas, los serovares vivos de *Salmonella enterica* están atenuados.

La presente invención desvela además serovares de *Salmonella enterica*, y/o la fabricación correspondiente de vacunas, que comprenden células con restricción de hierro e inactivadas con formalina de serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium e Infantis o Hadar que incluyen además el uso de *rinotraqueitis* aviar, una o más cepas del *virus de la bronquitis infecciosa*, *virus de la enfermedad de Newcastle* y *virus del síndrome de caída de la puesta*. En realizaciones alternativas, la presente invención proporciona además serovares de *Salmonella enterica*, y/o la fabricación correspondiente de vacunas, que comprenden células con restricción de hierro e inactivadas con formalina de serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium e Infantis o Hadar que incluyen además el uso de *rinotraqueitis* aviar, una o más cepas del *virus de la bronquitis infecciosa*, *virus de la enfermedad de Newcastle* y *virus de la enfermedad de bursitis infecciosa* (enfermedad de Gumboro) y Reovirus inactivados. En otras realizaciones más, la presente invención proporciona además serovares de *Salmonella enterica*, y/o la fabricación correspondiente de vacunas, que comprenden células con restricción de hierro e inactivadas con formalina de serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium e Infantis o Hadar que incluyen además el uso de Reovirus inactivados, una o más cepas del *virus de la bronquitis infecciosa*, (enfermedad de Gumboro) y un toxoide de *C. perfringens alpha*.

Todos los serovares de *Salmonella enterica* de la presente invención, y/o las vacunas correspondientes fabricadas mediante el uso de los serogrupos de *Salmonella enterica*, se pueden administrar una vez o mediante una primera vacuna (por ejemplo, primaria) seguida de una segunda vacuna (refuerzo) y/o vacunas de refuerzo adicionales. Como se ha mencionado anteriormente, los serovares de *Salmonella enterica* inactivados de la presente invención, y/o las vacunas correspondientes fabricadas mediante el uso de los serogrupos de *Salmonella enterica* inactivados, también se pueden administrar después de una vacunación de *Salmonella enterica* viva anterior del sujeto avícola.

Estos y otros aspectos de la presente invención se comprenderán mejor en referencia a las siguientes Figuras y la Descripción Detallada.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C comparan la eficacia de las vacunas de serovar trivalentes y/o tetravalentes y un control con

respecto al número de días después de una exposición a *S. Hadar*. Los datos se presentan como puntos individuales para cada ave. La eficacia se refleja mediante el \log_{10} de ufc/g del serovar expuesto que se aisló mediante hisopos cloacales. Las Figuras 1A y 1B comparan la eficacia de las dos vacunas trivalentes (SE/ST/SI y SE/ST/SH) y una vacuna tetravalente (Quad 1, SE/ST/SH/SI) *versus* un control.

5 La Figura 1A (Estudio 1 exposición a *Hadar*: hisopo cloacal de ave individual) representa los datos obtenidos en el Estudio 1 en el día 3 (□) y el día 5 (◆) después de la exposición, mientras que la Figura 1B (Estudio 2 *Hadar*: hisopos cloacal de aves individuales) representa los datos obtenidos en el Estudio 2 en los días 3 (□), 5 (▲) y 7 (◆) después de la exposición.

10 La Figura 1C (Estudio 3: liberación individual de aves *versus* tiempo. Exposición a *Hadar*) muestra los datos obtenidos en los días 3 (□), 5 (▲) y 7 (◆) del Estudio 3, que compara la eficacia de tres formulaciones tetravalentes diferentes (SE/ST/SH/SI) *versus* un control.

15 La Tabla 1 a continuación, proporciona el contenido de cada una de las vacunas probadas. Los valores medios se representan (⊕) en las Figuras 1A-1C. Las Figuras 2A-2B representan el porcentaje de aves positivas por cultivo directo, según se determina con aislamientos de órganos post mortem obtenidos el día 7 después de una exposición a *S. Hadar*.

La Figura 2A (Estudio 1 *Hadar*: proporción de aves positivas por cultivo directo (día 7)) muestra los resultados del Estudio 1, como se describe en la Figura 1A, comparando muestras post mortem del ciego, el hígado y el bazo.

la Figura 2B (Estudio 2 *Hadar*: proporción de aves positivas por cultivo directo (día 7)) muestra los resultados del Estudio 2, como se descritos en la Figura 1B, comparando muestras post mortem del ciego y el bazo.

20

La Tabla 1 a continuación, proporciona el contenido de cada una de las vacunas probadas.

Leyenda:  SE/ST/SH SE/ST/SI SE/ST/SH/SI Control

Las Figuras 3A-3C representan el porcentaje de aves positivas por cultivo directo, según se determina con aislamientos de órganos post mortem obtenidos el día 7 y/o el día 14 después de una exposición a *S. Infantis*.

25 Los estudios 1 y 2 comparan dos vacunas trivalentes (SE/ST/SI y SE/ST/SH) y una vacuna tetravalente (Quad 1, como se define a continuación) *versus* un control.

La Figura 3A (Estudio 1 *Infantis*: Proporción de muestras positivas directas el día 7) muestra la comparación de muestras de ciego post mortem en el día 7 para el Estudio 1.

30 La Figura 3B (Estudio 1 *Infantis*: Proporción de muestras positivas directas de bazo el día 14) muestra la comparación de muestras de bazo post mortem en el día 14 para el Estudio 1.

La Figura 3C (Estudio 2 *Infantis*: Proporción de muestras positivas directas el día 7) muestra la comparación de muestras de hígado y bazo post mortem en el día 7 para el Estudio 2. La Tabla 1 a continuación, proporciona el contenido de cada una de las vacunas probadas. La correlación del contenido de la vacuna y el sombreado del gráfico de barras es como se proporciona en las Figuras 2A-2B anteriores.

35 La Figura 4 representa los resultados de liberación del Ejemplo 3, de bacterias expuestas *S. Hadar* en \log_{10} de ufc/g medio que se recuperaron de muestras cloacales, por cultivo directo en todas las fechas de muestreo, para ambos grupos de prueba.

40 La Figura 5 presenta los resultados de diseminación del Ejemplo 3, en porcentaje del total de muestras positivas de bazo (por cultivo directo y por enriquecimiento) para ambos grupos de prueba, a los 10 y 14 días después de la exposición.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención desvela que a pesar de las diferencias antigénicas significativas previamente informadas entre los serovares de *Salmonella* de los grupos C1 y C2-3 como se discutió anteriormente, la cantidad de protección cruzada entre estos dos serogrupos distintos es suficiente para permitir que una vacuna, que comprende un serovar de cualquier serogrupo, proteja contra los serovares de ambos serogrupos. Más particularmente, se ha demostrado que la capacidad protectora de los antígenos producidos a partir de serovares del serogrupo C1 protege contra una exposición tanto a *S. Hadar* (C2/3) como a *S. Infantis* (C1).

50 Por consiguiente, la presente invención presenta datos que indican que una vacuna trivalente de *Salmonella* que comprende serovares de *Salmonella* de los serogrupos B, D y, además, C1, proporcionará una protección cruzada adecuada en los serogrupos B y D, así como C2-3 y C1. Las ventajas de dicha vacuna trivalente sobre una vacuna tetravalente incluyen minimizar el coste de los productos y minimizar la probabilidad de interferencia de un antígeno sobre otro.

55 En un aspecto de la presente invención, los serovares de *Salmonella* enterica se cultivan en un medio con restricción de hierro. La incorporación de un quelante de hierro en el medio de crecimiento de los serovares de *Salmonella* induce a las bacterias a activar sus mecanismos de secuestro de hierro, lo que da como resultado una fisiología más estrechamente alineada al crecimiento *in vivo* que los organismos cultivados de manera más convencional. Este proceso de cultivo de *Salmonella* con restricción de hierro conduce a la producción de anticuerpos contra antígenos vistos durante la infección y colonización en el campo y, por lo tanto, proporciona una respuesta inmunitaria más eficaz.

60

5 En una realización específica, una vacuna trivalente de la presente invención puede ser para la reducción de una infección de *S. Enteritidis*, Typhimurium, Hadar e Infantis o eliminación o transmisión horizontal o invasión de órganos internos durante la cría y puesta, para gallinas utilizadas para la producción de huevos, es decir, ponedoras. En otra realización específica, una vacuna trivalente de la presente invención puede ser para la reducción de una infección de *S. Enteritidis*, Typhimurium, Hadar e Infantis o eliminación o transmisión horizontal o invasión de órganos internos durante las primeras semanas de vida de la progenie por protección pasiva, para su uso en aves de corral utilizadas en la cría de aves de corral para carne, es decir, pollos de engorde y/o asadores.

10 El uso de términos singulares por conveniencia en la descripción de ninguna manera pretende ser tan limitante. Así, por ejemplo, la referencia a un "serovar" incluye la referencia a uno o más de dichos serovares, a menos que se especifique otra cosa. El uso de términos plurales tampoco pretende ser limitante. El término "aproximadamente" se usa indistintamente con el término "sobre" y significa que un valor está dentro del cincuenta por ciento del valor indicado, es decir, una dosis que contiene "aproximadamente" 2×10^9 células/ml pueden contener entre 1 y 3×10^9 células/ml.

20 Como se usa en el presente documento, una "vacuna" es una composición que es adecuada para la aplicación a un animal (incluidos, en determinadas realizaciones, seres humanos, mientras que para otras realizaciones no son específicamente para seres humanos) que, tras la administración al animal, por ejemplo, pollo, induce una respuesta inmunitaria lo suficientemente fuerte como para ayudar mínimamente en la protección contra una enfermedad clínica que surge de una infección con un microorganismo de tipo silvestre, es decir, lo suficientemente fuerte como para ayudar en la prevención de la enfermedad clínica, y/o prevención, mejora o cura de la enfermedad clínica. A menos que se indique expresamente lo contrario, el uso del término vacuna incluye vacunas multivalentes. Por consiguiente, una vacuna trivalente que se ejemplifica a continuación comprende células con restricción de hierro e inactivadas con formalina de serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium, e Infantis.

30 Como se usa en el presente documento, una "vacuna multivalente" es una vacuna que comprende dos o más antígenos diferentes. En una realización particular de este tipo, la vacuna multivalente estimula el sistema inmunológico del receptor contra dos o más agentes patógenos diferentes.

35 Como se usa en el presente documento, los términos "proteger", "que protege", "proporcionar protección a", "que proporciona protección a" y "ayudas en la protección" no requieren protección completa contra cualquier indicación de infección. Por ejemplo, "ayudas en la protección" puede significar que la protección es suficiente para que, después de la exposición, los síntomas de la infección subyacente son al menos reducidos, y/o al menos una o más de las causas o mecanismos celulares, fisiológicas, o bioquímicas subyacentes que causan los síntomas se reducen y/o eliminan. Se comprende que "reducido", tal como se usa en este contexto, significa en relación con el estado de la infección, incluido el estado molecular de la infección, no solo el estado fisiológico de la infección.

40 Como se usa en el presente documento, la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de un antígeno dado, por ejemplo, aislado de *Salmonella* destruido, que es suficiente para proporcionar protección y/o ayudar en la protección contra el patógeno contra el que se está administrando el antígeno, cuando se proporciona en una sola administración y/o cuando se pretende, siempre que se trate de una administración inicial con una o más administraciones de refuerzo posteriores.

45 Como se usa en el presente documento, una vacuna "eficaz" comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un antígeno dado.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se usa adjetivamente para significar que el nombre modificado es apropiado para su uso en un producto farmacéutico. Cuando se usa, por ejemplo, para describir un excipiente en una vacuna farmacéutica, caracteriza al excipiente como compatible con los otros ingredientes de la composición y no desventajosamente perjudicial para el receptor deseado.

55 El término "transportador" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra el compuesto. Los vehículos farmacéuticamente aceptables pueden ser líquidos estériles, tales como agua y/o aceites, incluidos aquellos de origen en el petróleo, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. Las soluciones salinas de agua o solución acuosa y las soluciones acuosas de dextrosa y glicerol pueden emplearse como vehículos, particularmente para soluciones inyectables.

60 Como se usa en el presente documento, un "adyuvante" es una sustancia que es capaz de favorecer o amplificar la cascada de eventos inmunológicos, lo que lleva en última instancia a una mejor respuesta inmunitaria, es decir, la respuesta corporal integrada a un antígeno. En general, no se requiere un adyuvante para que se produzca la respuesta inmunitaria, pero favorece o amplifica esta respuesta.

65 Como se usa en el presente documento, "administración sistémica" es la administración en el sistema circulatorio del cuerpo (que comprende el sistema cardiovascular y linfático), afectando así al cuerpo como un todo en lugar de un locus específico como el tracto gastrointestinal (a través de, por ejemplo, administración oral o rectal) y el sistema

respiratorio (*a través de*, por ejemplo, administración intranasal). La administración sistémica se puede realizar, por ejemplo, mediante la administración en el tejido muscular (intramuscular), en la dermis (intradérmica, transdérmica o supradérmica), debajo de la piel (subcutánea), debajo de la mucosa (submucosa), en las venas (intravenosa), etc.

- 5 La "administración parenteral" incluye inyecciones subcutáneas, inyecciones submucosas, inyecciones intravenosas, inyecciones intramusculares, inyecciones intradérmicas e infusión.

Como se usa en el presente documento, el término "aves de corral" puede incluir pollos, pavos, patos, gansos, codornices y faisanes. *Vacunas*:

- 10 La presente invención proporciona vacunas que contienen un miembro de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 que proporcionan protección suficiente contra serovares de ambos serogrupos C1 y C2-3. En una realización particular de la presente invención, la vacuna es una suspensión líquida de células destruidas (por ejemplo, con formalina o inactivación por calor) con restricción de hierro de serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium, e
15 Infantis. En una realización más particular, los serovares de *Salmonella enterica* destruidos se destruyen con formalina. En una de dichas realizaciones, la concentración final de cada antígeno es de aproximadamente 2×10^9 células/ml. En otra realización, la vacuna comprende adyuvante de hidróxido de aluminio a aproximadamente un 25 % v/v. En una realización relacionada, la vacuna se administra por vía intramuscular. En otra realización relacionada, la vacuna se administra a aves de corral (por ejemplo, pollos) a la edad mínima de seis semanas.

- 20 La presente invención proporciona además el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 y opcionalmente un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo B y/o serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo D en la fabricación de una vacuna de la presente invención que incluye además el uso de una o más cepas de *rinotraqueitis* aviar, *virus de la bronquitis infecciosa*, *virus de la enfermedad de Newcastle*, *enfermedad de bursitis infecciosa* (enfermedad de Gumboro), *virus del síndrome de la caída de la puesta*, *Reovirus*, y un antígeno de *Clostridial perfringens* (*C. perfringens*). En realizaciones particulares, el antígeno de *C. perfringens* es un toxoide alfa de *C. perfringens* [véanse, el documento WO2006/113722; el documento US 2006/0233825 A1, cuyo contenido se
25 incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad]. En otras realizaciones de este tipo, el antígeno de *C. perfringens* es un organismo de *C. perfringens* atenuado recombinante [véase, el documento EP 7.732.187 B2, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad]. En otras realizaciones más, el antígeno de *C. perfringens* es una muteína sustancialmente no tóxica de la toxina alfa de *C. perfringens* [véase, el documento EP 7.972.604 B2, cuyo contenido se incorpora en el presente documento como referencia en su totalidad].

- 35 La presente invención también desvela el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 en la fabricación de una vacuna de la presente invención que incluye además el uso de una o más cepas de *rinotraqueitis* aviar, *virus de la bronquitis infecciosa*, *virus de la enfermedad de Newcastle* y *virus del síndrome de caída de la puesta*. Dichas vacunas pueden estar especialmente dirigidas a gallinas productoras de huevos (es decir, ponedoras).

- 40 En realizaciones alternativas, la presente invención desvela el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 en la fabricación de una vacuna de la presente invención que incluye además el uso de *rinotraqueitis* aviar, una o más cepas del *virus de la bronquitis infecciosa*, *virus de la enfermedad de Newcastle* y *virus de la enfermedad de bursitis infecciosa* (enfermedad de Gumboro) y *Reovirus* inactivados. En realizaciones alternativas, la presente invención desvela el uso de un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 en la fabricación de una vacuna de la presente invención que incluye además el uso de *Reovirus* inactivados, una o más cepas del *virus de la bronquitis infecciosa*, *virus de la enfermedad de bursitis infecciosa* (enfermedad de Gumboro) y un antígeno de *C. perfringens*, por ejemplo, un toxoide alfa de *C. perfringens*. Dichas vacunas pueden estar especialmente dirigidas a aves de corral utilizadas en el negocio de la carne (es decir, pollos de engorde y asadores).

- 50 La presente invención desvela además la fabricación de vacunas que comprenden células con restricción de hierro e inactivadas con formalina de serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium e Infantis o Hadar que incluyen además el uso de *rinotraqueitis* aviar, una o más cepas del *virus de la bronquitis infecciosa*, *virus de la enfermedad de Newcastle*, *enfermedad de bursitis infecciosa* (enfermedad de Gumboro), *virus del síndrome de la caída de la puesta*, *Reovirus*, y una antígeno de *Clostridial perfringens*.

- 55 Las vacunas y las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden, pero no necesariamente incluyen, tampones fisiológicamente compatibles y solución salina y similares, así como adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En determinadas realizaciones de la presente invención, las vacunas y/o composiciones inmunogénicas de la presente invención se almacenan congeladas y, en consecuencia, comprenden un crioprotector, tal como dimetilsulfóxido (DMSO), para preservar las células infectadas congeladas.

- 60 También se contempla que la vacuna se pueda congelar y secar al vacío (liofilizar) o reducir de otro modo el volumen del líquido, para el almacenamiento, y luego se reconstituye en un diluyente líquido antes o en el momento de la administración. Dicha reconstitución se puede lograr usando, por ejemplo, agua de grado de vacuna. En determinadas realizaciones, una porción liofilizada de una vacuna multivalente puede comprender uno o más antígenos y el diluyente
65 puede comprender uno o más antígenos.

En realizaciones particulares, una vacuna de la presente invención (o una porción de la misma) puede estar en forma liofilizada, por ejemplo, como comprimidos y/o esferas que se producen mediante un método descrito en el documento WO 2010/125084, incorporado por la presente como referencia en su totalidad. En particular, se hace referencia a los ejemplos, de la página 15, línea 28 a la página 27, línea 9 del documento WO 2010/125084, que describen un método para producir dichos comprimidos/esferas de desintegración rápida. Dichas formas liofilizadas se pueden disolver fácilmente en un diluyente, para permitir la administración sistémica de la vacuna.

Administración de vacunas:

Las vacunas y/o composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden administrarse mediante cualquier medio convencional, por ejemplo, mediante administración sistémica, incluyendo mediante administración parenteral tal como, sin limitación, administración intramuscular o subcutánea, inyección intravenosa, inyección intradérmica, *en el huevo*, o mediante combinaciones de las mismas. Las vacunas de la presente invención también pueden administrarse mediante administración en la mucosa, tal como mediante administración intranasal, intratraqueal, rectal y/u ocular. Como alternativa, las vacunas pueden administrarse *a través de* un parche para la piel, escarificación o administración tópica. Se contempla que una vacuna de la presente invención también se puede administrar mediante administración oral, incluso *a través* del agua potable y/o la comida del receptor.

Las vacunas (incluidas las vacunas multivalentes) de la presente invención también se pueden administrar como parte de una terapia de combinación, es decir, una terapia que incluye, además de la vacuna en sí misma, administrar uno o más agentes activos adicionales, terapias, etc. En ese caso, debe reconocerse que la cantidad de vacuna que constituye una cantidad "terapéuticamente eficaz" puede ser mayor o menor que la cantidad de vacuna que constituiría una cantidad "terapéuticamente eficaz" si la vacuna se administrara sola. Otras terapias pueden incluir aquellas conocidas en la materia, tales como, por ejemplo, analgésicos, medicamentos para reducir la fiebre, expectorantes, medicamentos antiinflamatorios, antihistamínicos y/o administración de fluidos.

El nivel de inmunogenicidad puede determinarse experimentalmente mediante técnicas de estudio de titulación de dosis de exposición generalmente conocidas en la materia. Dichas técnicas normalmente incluyen la vacunación de varios sujetos animales con la vacuna a diferentes dosis y luego la exposición de los sujetos animales con el serovar virulento apropiado de *Salmonella enterica* para determinar la dosis protectora mínima.

Dosis/intervalo de administración:

En realizaciones particulares, se administran dos dosis de 0,5 ml de una vacuna de la presente invención con al menos cuatro semanas de diferencia. En realizaciones particulares, la edad mínima para la primera vacunación es de 6 semanas, y la segunda dosis debe administrarse al menos 3 a 4 semanas antes de la puesta.

Otros factores que afectan el régimen de dosificación preferido pueden incluir, por ejemplo, la edad, el peso, el sexo, la dieta, actividad, el tamaño del pulmón y la condición del sujeto; la vía de administración; los perfiles de eficacia, seguridad y duración de la inmunidad de la vacuna particular utilizada; si se utiliza un sistema de administración; y si la vacuna se administra como parte de una combinación de fármaco y/o vacuna. Así, la dosis realmente empleada puede variar para animales específicos y, por lo tanto, puede desviarse de las dosis normales establecidas anteriormente. La determinación de dichos ajustes de dosis está generalmente dentro de la habilidad de los expertos en la materia del desarrollo de vacunas usando medios convencionales. Se contempla que la vacuna se pueda administrar al receptor de la vacuna en un solo momento o alternativamente, dos o más veces durante días, semanas, meses o años. En algunas realizaciones, la vacuna se administra al menos dos veces. En determinadas de estas realizaciones, por ejemplo, la vacuna se administra dos veces, administrándose la segunda dosis (por ejemplo, un refuerzo) al menos 2 semanas después de la primera dosis. En realizaciones particulares, la vacuna se administra dos veces, administrándose la segunda dosis no más de 8 semanas después de la primera dosis. En otras realizaciones, la segunda dosis se administra de 1 semana a 2 años después de la primera dosis, de 1,5 semanas a 8 semanas después de la primera dosis, o de 2 a 4 semanas después de la primera dosis. En otras realizaciones, la segunda dosis se administra aproximadamente 3 semanas después de la primera dosis.

En las realizaciones anteriores, la primera y las dosificaciones posteriores pueden variar, tal como en cantidad y/o forma. A menudo, sin embargo, las dosificaciones son las mismas en cantidad y forma. Cuando solo se administra una dosis única, la cantidad de vacuna en esa dosis sola generalmente comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la vacuna. Cuando, sin embargo, se administra más de una dosis, las cantidades de vacuna en esas dosis juntas pueden constituir una cantidad terapéuticamente eficaz. Además, se puede administrar inicialmente una vacuna, y luego se puede administrar un refuerzo de 2 a 12 semanas después, como se ha analizado anteriormente. Sin embargo, las administraciones posteriores de la vacuna se pueden realizar de forma anual (1 año) o bianual (2 años), independientemente de si se administró un refuerzo o no.

La presente invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ejemplos de la invención. Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar más completamente las realizaciones de la invención. No deben interpretarse de ningún modo, sin embargo, como limitantes del amplio alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 **Comparación de vacunas que contienen diferentes serovares de *Salmonella***

Se prepararon vacunas que contenían serovares inactivados de *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*; SE) y *Salmonella* Typhimurium (*S. Typhimurium*; ST) (NB: Los serovares de *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* fueron los mismos que los de SALENVAC T) solos, o en combinación con serovares inactivados de *Salmonella* Hadar (*S. Hadar*; SH) y/o *Salmonella* Infantis (*S. Infantis*; SI). Todos los serovares habían crecido en un medio con restricción de hierro y se inactivaron con formalina antes de su uso. Las formulaciones de las vacunas utilizadas en los estudios se enumeran en la Tabla 1.

Tabla 1: Composiciones de vacunas

Vacuna	<i>S. Enteritidis</i> células/ml	<i>S. Typhimurium</i> células/ml	<i>S. Infantis</i> células/ml	<i>S. Hadar</i> células/ml	Hidróxido de aluminio
SE/ST	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹			25 %
SE/ST/SI	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹		25 %
SE/ST/SH	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹		2 x 10 ⁹	25 %
Quad 1	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹	40 %
Quad 2	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹	2 x 10 ⁹	25 %
Quad 3	1 x 10 ⁹	1 x 10 ⁹	1 x 10 ⁹	1 x 10 ⁹	25 %

15 La vacuna tetravalente SE/ST/SH/SI 1 (Quad 1) contenía una cantidad adicional de adyuvante, porque estudios previos con vacunas análogas que contenían un alto número de células habían sugerido que un contenido de hidróxido de aluminio de un 25 % podría ser inadecuado para una vacuna que contiene 8 x 10⁹ células/ml en total. La vacuna tetravalente SE/ST/SH/SI 2 (Quad 2) contenía un 25 % de adyuvante para investigar la hipótesis de concentración de adyuvante, y la vacuna tetravalente SE/ST/SH/SI 3 (Quad 3) contenía la mitad de la dosis de todos los antígenos para proporcionar una vacuna que tenga la misma concentración celular total que SALENVAC T (SE/ST) disponible comercialmente.

20 Dos estudios (Estudio 1 y Estudio 2) compararon la eficacia de las dos vacunas trivalentes individuales (SE/ST/SI y SE/ST/SH) con Quad 1, e incluyeron un control. Un tercer estudio, (Estudio 3) comparó las tres formulaciones tetravalentes contra una exposición a *S. Infantis* o *S. Hadar* e incluyó los controles apropiados. La eficacia de las vacunas se probó utilizando una raza de gallinas ponedoras de un proveedor comercial. Las aves recibieron dos vacunas intramusculares separadas por tres semanas y se expusieron tres semanas después con una dosis oral de aproximadamente 10¹⁰ ufc de *S. Hadar* o *S. Infantis*.

30 Las muestras se procesaron de la siguiente manera: La muestra pesada se homogeneizó en agua de peptona tamponada estéril (BPW, de sus siglas en inglés). Los grumos se dejaron sedimentar y una parte alícuota del sobrenadante se diluyó en serie en BPW estéril. Se usaron alícuotas del sobrenadante y las diluciones para inocular placas de agar selectivas de *Salmonella*. Se usó una segunda alícuota del sobrenadante para inocular una botella de caldo de Rappaport Vassiliadis, que es un medio selectivo para *Salmonella* [véase, Rappaport et al., J. Clin. Pathol. 9:261-266 (1956); Vassiliadis, et al., J. Appl. Bacteriol. 44:233-239 (1978)]. Los caldos y las placas se incubaron a la temperatura adecuada. Se examinaron las placas para detectar *Salmonella* y se contaron las colonias. Esto proporciona la recuperación directa que puede expresarse como recuentos por gramo de muestra o como positivo directo. Cuando no se observa *Salmonella* en las placas relacionadas con una muestra, el caldo de Rappaport Vassiliadis correspondiente se inocula en una placa selectiva de *Salmonella* y se incuba. Cuando se observa *Salmonella*, el resultado se registra como enriquecimiento positivo, mientras que cuando no se observa *Salmonella*, el resultado es negativo. Las diferencias entre los grupos pueden verse como diferencias en la cantidad de *Salmonella* aislada, la cantidad de positivos directos o la cantidad total de positivos (enriquecimiento directo *plus*).

45 Los estudios mostraron que estos serovares y *S. Infantis*, así como otras cepas y serovares del grupo C1, no colonizaron lo suficiente como para dar un perfil de liberación que demostraría consistentemente una liberación reducida de las aves vacunadas. Además, el uso de dicha dosis de exposición tan alta podría abrumar el nivel de protección obtenido, evitando así una demostración reproducible de eficacia, particularmente con respecto a la liberación.

50 La eficacia de la vacunación se determinó mediante la comparación de la liberación del serovar de exposición en los hisopos cloacales. Los resultados de la dispersión se expresan como comparaciones del número de organismos que se desprenden detectados por cultivo directo y el número de hisopos cloacales positivos de los grupos. Además, la protección contra la invasión del hígado y el bazo se determinó en un examen post mortem. Los resultados del aislamiento de órganos post mortem se expresan como un porcentaje de aves positivas en cada grupo, ya sea por cultivo directo o después del enriquecimiento (véase, Tabla 2).

La exposición a *S. Infantis* en estos estudios no fue sólida. Incluso con la alta dosis de exposición utilizada, la dispersión fue demasiado baja en las aves de control para obtener resultados significativos, sin embargo, se observó en el Estudio 3 que la dispersión aumentó en el día 7 en todos los grupos, es decir, no se observó reducción en las aves vacunadas. Se cree que las altas dosis de exposición utilizadas podrían romper el nivel de protección obtenido después de la vacunación. Resultados similares han sido informados por otros grupos que usan modelos de exposición a *S. Infantis*. Es probable que las diferencias aparentes en la eficacia de las diferentes formulaciones probadas se deban a la variabilidad en la toma de exposición entre los estudios individuales.

Tabla 2: Resumen de los resultados de Estudios de exposición

Exposición	S. Hadar				S. Infantis				
	Vacuna	Dispersión	Ciego	Hígado	Bazo	Dispersión	Ciego	Hígado	Bazo
SE/ST/SI (Estudio 1)	✓	X	✓	X	SR	✓/X	SR	X	
SE/ST/SI (Estudio 2)	✓	✓/X	SR	✓/X	SR	SR	✓	X	
SE/ST/SH (Estudio 1)	✓	X	✓	✓	SR	I/X	SR	X	
SE/ST/SH (Estudio 2)	✓	X	SR	✓	SR	SR	X	X	
Quad 1 (Estudio 1)	✓	X	X	✓	SR	✓	SR	✓	
Quad 1 (Estudio 2)	✓/X	X	SR	✓	SR	SR	X	X	
Quad 1 (Estudio 3)	✓	X	SR	✓	SR*	X	✓/X	X	
Quad 2 (Estudio 3)	✓	X	SR	✓	SR*	X	✓	X	
Quad 3 (Estudio 3)	✓	X	SR	✓	SR*	X	✓	X	

✓ - protección mostrada mediante la reducción en los recuentos o el número de positivos.
 X - indica que no se observa protección, es decir, no hay reducción en los recuentos o en el número de positivos.
 SR - Sin resultado. Los recuentos o el número de positivos en los controles fueron demasiado bajos.
 SR* - mismo patrón de dispersión en todos los grupos, véase a continuación.
 ✓/X - un resultado dudoso.

Resultados

Los resultados para los aislamientos de los hisopos cloacales se muestran en las Figuras 1A-1C como puntos individuales para cada ave y denotan el log₁₀ de ufc/g del serovar expuesto. Los recuentos medios de cada grupo se muestran unidos por una línea continua para mayor claridad. Los resultados de los aislamientos de muestras post mortem en las Figuras 2A-2B y Figuras 3A-3C se expresan como el porcentaje de muestras que fueron positivas para el aislamiento de la exposición. En el Estudio 1, se tomaron muestras post mortem de algunas aves en cada grupo en el día 7 y el resto en el día 14 después de la exposición.

Eficacia contra la dispersión después de una exposición a *S. Hadar*:

Estudio 1: La Figura 1A muestra que, entre el día 3 y el día 5 después de la exposición a *S. Hadar*, la dispersión de las aves de control se mantuvo a aproximadamente 3 log₁₀, y en el día 5 todas las aves fueron positivas por cultivo directo. Para todos los grupos vacunados, SE/ST/SI, SE/ST/SH y Quad 1 (véase la Tabla 1 anterior), incluida la vacuna trivalente formulada con *S. Infantis* (SE/ST/SI), la dispersión promedio disminuyó durante el período y aumentó el número de aves negativas por cultivo directo. La vacuna homóloga (SE/ST/SH) tuvo el mayor descenso, mientras que la vacuna tetravalente (Quad 1) tuvo el mayor número de aves negativas.

Estudio 2: el Estudio 2 fue una repetición del Estudio 1 anterior, excepto como se muestra en la Figura 1B, los datos se incluyen para el día 7 después de la exposición a *S. Hadar*. Como se puede ver en la Figura 1B, la dispersión media fue nuevamente alrededor de 3 log₁₀, pero hubo una serie de aves en el grupo de control que no se liberaron de la exposición según lo detectado por el cultivo directo y, en consecuencia, la dispersión media de los grupos vacunados fue en algunos casos superior al grupo control. Sin embargo, el efecto de la vacunación se confirma por la rápida disminución en la dispersión promedio (los conteos son al menos 10 veces más bajos que en el grupo de control para el día 7) y el creciente número de aves negativas en cada uno de los grupos de vacunas trivalentes. La vacuna tetravalente, Quad 1, no funcionó tan bien en el Estudio 2 como en el Estudio 1.

Estudio 3: Como se muestra en la Figura 1C, los tres grupos de vacunas tetravalentes, es decir, Quad 1, Quad 2 y Quad 3 (véase, la Tabla 1 anterior) tuvieron recuentos aproximadamente 10 veces más bajos que el grupo de control para el día 7. Esto incluyó el grupo vacunado con Quad 3, que era la formulación que tenía la dosis de antígeno al 50 %. Los dos grupos vacunados con las vacunas que contienen adyuvante al 25 %, es decir, Quad 2 y Quad 3, también mostraron recuentos más bajos en el día 3 y el día 5 que el grupo vacunado con la vacuna que contiene el adyuvante al 40 %, es decir, Quad 1.

Aislamientos post mortem después de una exposición a S. Hadar:

5 En el Estudio 1, en el día 7, el contenido cecal de la mayoría de las aves en todos los grupos fue positivo (véase, la Figura 2A). En el hígado, cada vacuna trivalente redujo la invasión en la medida en que ninguna muestra fue directamente positiva. La reducción en la proporción de muestras de bazo, que fueron directamente positivas, parece mostrar un efecto específico de serovar, donde solo la vacuna trivalente que contiene células de S. Hadar y la vacuna tetravalente mostraron una reducción. Hubo pocas muestras positivas de cualquier muestra de hígado o bazo tomadas el día 14 después de la exposición.

10 Los resultados del Estudio 2 muestran que el grupo de vacuna trivalente SE/ST/SI había reducido el número de muestras positivas de contenido cecal en comparación con los otros grupos (véase, Figura 2B). El patrón de aislamientos del bazo fue similar al Estudio 1, aunque la proporción de controles positivos fue mayor, y todas las vacunas mostraron una reducción en la proporción de muestras positivas. Hubo muy pocas muestras positivas de los hígados de las aves de control en este estudio para un análisis válido.

15 En el Estudio 3, mientras que las muestras de contenido cecal de todas las aves fueron positivas, pocas muestras de hígado fueron positivas (5 de 15 controles en comparación con 1 o 2 de 12 aves vacunadas). Cada vacuna mostró un nivel de protección contra la colonización del bazo con las vacunas que contenían un adyuvante al 25 % con las proporciones más bajas de positivos como se muestra en la Tabla 3 a continuación.

20

Tabla 3: Porcentaje de muestras de bazo positivas

Dosis de vacuna/adyuvante	Completa/40 %	Completa/25 %	Media/25 %	Control
Porcentaje positivo	58	33*	31*	87

* Significativamente diferente a los controles $p = < 0,05$ Eficacia contra la dispersión después de una exposición a S. Infantis:

25 En los estudios 1 y 2 no hubo indicios claros de que S. Infantis colonizara el ciego en las aves de control. A los siete días después de la exposición, no hubo aves positivas por cultivo directo. En el Estudio 3, las diferencias en los recuentos medios entre los grupos en cada día fueron bajas, aunque las vacunas tetravalentes 1 y 2 tuvieron menos aves positivas en cultivo directo en el día 3 después de la exposición en comparación con los controles y Quad 3, véase, la Tabla 4 a continuación. Los recuentos aumentaron notablemente del día 5 al día 7 en cada grupo, lo que indica que la dosis de exposición fue lo suficientemente alta como para romper la protección.

30

Tabla 4: Porcentaje de aves positivas directas en la exposición posterior al día 3

Dosis de vacuna/adyuvante	Completa/40 %	Completa/25 %	Media/25 %	Control
Porcentaje positivo	8,3	0	33	42,8

Aislamientos post mortem después de una exposición a S. Infantis:

35

En el Estudio 1 en el día 7 posterior a la exposición a S. Infantis, hubo menos muestras positivas de contenido cecal en cualquiera de los grupos vacunados en comparación con los controles, pero las proporciones de hígado y bazo positivos de los controles fueron demasiado bajas para que realizar un análisis significativo (véase, la Figura 3A). Los datos de la muestra de bazo del día 14 posterior a la exposición mostraron una reducción en la proporción de muestras positivas del grupo tetravalente (Quad 1) en comparación con los controles (véase, la Figura 3B).

40

En el estudio 2 en el día 7, había muy pocas muestras positivas del ciego para un análisis válido. No se observó reducción en la proporción de muestras positivas de bazo con ninguna de las formulaciones (véase, la Figura 3C). Sin embargo, se observó protección homóloga contra la invasión del hígado ya que había menos muestras positivas directas tanto de la vacuna trivalente SE/ST/SI como de la vacuna tetravalente (Quad 1; véase, la Figura 3C).

45

Tabla 5: Porcentaje de muestras positivas de hígado en post mortem

Dosis de vacuna/adyuvante	Completa/40 %	Completa/25 %	Media/25 %	Control
Porcentaje positivo	58	36	40	71

50 En el Estudio 3, en el examen *post mortem* del día 7 no se observó ningún efecto protector con respecto a las reducciones en la proporción de muestras positivas de ciego o bazo para ninguna de las formulaciones. Sin embargo, cada vacuna mostró un nivel de protección contra la invasión hepática con las vacunas que contienen adyuvante al 25 % (Quad 2 y Quad 3) que tienen las proporciones más bajas de positivos como se muestra en la Tabla 5 anterior.

Ejemplo 2**Protección pasiva en pollos de engorde expuestos a S. Hadar o S. Infantis a los 4 días de edad**

- 5 Las aves parentales se vacunaron con una vacuna combinada de *S. Enteritidis* + *S. Typhimurium* + *S. Infantis* (SE/ST/SI) con Rehydrogel™ al 25 % o, alternativamente, se dejaron sin vacunar como controles. Los pollos de engorde a los cuatro días de edad que habían nacido de los huevos de las gallinas vacunadas o no vacunadas, se expusieron a *S. Hadar* o *S. Infantis* para probar la protección pasiva contra estos dos serovares distintos.
- 10 La recuperación de los serovares de exposición de las aves de estudio fue alta. No se observaron diferencias entre los grupos vacunados y de control para la dispersión de la exposición mediante el control con hisopo de cloaca o en el contenido cecal post mortem. Sin embargo, hubo menos aves positivas en los grupos vacunados que en los grupos de control cuando se consideró la invasión tanto al hígado como al bazo. Esto se encontró más consistentemente en los 10 días posteriores al muestreo de exposición y cuando se utilizó una exposición de 10^2 ufc de *S. Hadar* o 10^3 ufc
- 15 de *S. Infantis*. Los grupos de exposición *S. Hadar* y *S. Infantis* mostraron resultados muy similares para la protección contra la invasión de órganos a pesar del hecho de que el lote parental recibió una vacuna que comprendía *S. Infantis*, pero no *S. Hadar*. Estos resultados son consistentes con los del Ejemplo 1 anterior, y por lo tanto, proporcionan una fuerte evidencia de protección cruzada entre estos dos subgrupos distintos de *Salmonella enterica*.

Métodos experimentales

- Los huevos de los grupos parentales que habían sido vacunados con una vacuna combinada de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Infantis* (SE/ST/SI), o alternativamente, no habían sido vacunados, se almacenaron, eclosionaron e incubaron por separado para asegurar que se pudo identificar el origen de los pollitos nacidos. Al día de edad, los
- 25 pollitos fueron asignados a cuatro grupos de 15 de aves vacunadas y cuatro de aves no vacunadas, con cada grupo contenido por separado. Las aves se expusieron a los 4 días de edad a la cepa de *Salmonella* apropiada y la dosis de acuerdo con la asignación del grupo (véase la Tabla 6 a continuación).

Tabla 6: Protocolo experimental para la exposición de protección pasiva

Grupo	Aves (N.º)	Vacunación	Cepa de exposición	Dosis (por 0,5 ml)
1	15	SE/ST/SI	<i>S. Hadar</i>	10 ² ufc
2	15	Control	<i>S. Hadar</i>	
3	15	SE/ST/SI	<i>S. Hadar</i>	10 ⁴ ufc
4	15	Control	<i>S. Hadar</i>	
5	15	SE/ST/SI	<i>S. Infantis</i>	10 ³ ufc
6	15	Control	<i>S. Infantis</i>	
7	15	SE/ST/SI	<i>S. Infantis</i>	10 ⁵ ufc
8	15	Control	<i>S. Infantis</i>	

- 30 El curso de la infección se controló mediante un examen con hisopo cloacal de las aves a los 3, 5, 7 y 10 días después de la exposición. La presencia de los organismos de exposición en el contenido cloacal y cecal y la diseminación a muestras de hígado y bazo se determinó mediante un examen *post mortem* de la mitad de las aves en cada grupo a los 7 días después de la exposición y el resto a los 10 días después de la exposición.

Resultados

- 35 Exposición posterior S. Hadar: No se observó reducción en la dispersión o diferencia en los aislamientos cecales de los vacunados en comparación con los controles con cualquiera de las dosis de exposición.

- 40 En los días 7 y 10 después de la exposición al nivel de exposición más alto (10^4 ufc/dosis) se observó una reducción en los aislamientos del hígado y el bazo el día 7 y el día 10, y para el nivel de exposición más bajo (10^2 ufc/dosis) se observó una reducción al comparar los vacunados con los controles para el hígado y el bazo en el día 10 después de la exposición. La proporción de aves positivas refleja los números aislados con grupos vacunados que tienen menos
- 45 muestras positivas en los días 7 y 10, después de una exposición de dosis más baja. La exposición de dosis baja solo mostró un efecto protector de la vacunación en el día 10 después de la exposición. Sin embargo, esta fue la mayor diferencia entre las aves vacunadas y las de control y reflejó un aumento de la proporción de aves de control positivo frente a una reducción de la proporción de aves del grupo vacunado positivo. Los resultados se tabulan como un
- 50 porcentaje total de aves positivas después de la exposición a *S. Hadar* en la Tabla 7 a continuación.

Tabla 7: Porcentaje total de aves positivas después de una exposición a S. Hadar (cultivo directo y de enriquecimiento en los días 7 y 10)

Grupo	Vacunación	Cepa de exposición	% positivo total, día 7		
			Cecal	Hígado	Bazo
1	SE/ST/SI	10 ² S. Hadar	100 %	38 %	25 %
2	Control	10 ² S. Hadar	100 %	0 %	0 %
3	SE/ST/SI	10 ⁴ S. Hadar	100 %	25 %	50 %
4	Control	10 ⁴ S. Hadar	100 %	63 %	75 %
			% positivo total, día 10		
1	SE/ST/SI	10 ² S. Hadar	100 %	17 %	33 %
2	Control	10 ² S. Hadar	100 %	71 %	71 %
3	SE/ST/SI	10 ⁴ S. Hadar	100 %	14 %	57 %
4	Control	10 ⁴ S. Hadar	100 %	57 %	86 %

- 5 Exposición posterior a S. Infantis: La exposición a S. Infantis a 10³ ufc inicialmente mostró una reducción en la dispersión del grupo vacunado el día 3, sin embargo, esta diferencia entre grupos se redujo en los días posteriores de muestreo. El nivel de exposición de dosis más alto (10⁵ ufc/dosis) no mostró reducción en la dispersión de los grupos vacunados en todos los puntos de tiempo. Casi todas las muestras cecales fueron positivas.
- 10 Los aislamientos de S. Infantis del hígado y el bazo dieron como resultado menos muestras positivas de los grupos vacunados que de control en el día 7 después de la exposición con la dosis de exposición más alta, mientras que ambos niveles de exposición mostraron un efecto protector de la vacunación en el día 10 (véase, Tabla 8 a continuación). Con la dosis de exposición más baja hubo una reducción en la proporción de aves positivas entre 7 y 10 días en comparación con una proporción creciente de aves de control positivo.

15

Tabla 8: Porcentaje total de aves positivas después de una exposición a S. Infantis (cultivo directo y de enriquecimiento)

Grupo	Vacunación	Cepa de exposición	% positivo total, día 7		
			Cecal	Hígado	Bazo
5	SE/ST/SI	10 ³ S. Infantis	100 %	50 %	75 %
6	Control	10 ³ S. Infantis	100 %	38 %	25 %
7	SE/ST/SI	10 ⁴ S. Infantis	100 %	50 %	50 %
8	Control	10 ⁵ S. Infantis	100 %	88 %	88 %
			% positivo total. Day10		
5	SE/ST/SI	10 ³ S. Infantis	100 %	14 %	43 %
6	Control	10 ³ S. Infantis	100 %	71 %	86 %
7	SE/ST/SI	10 ⁵ S. Infantis	100 %	29 %	57 %
8	Control	10 ⁵ S. Infantis	86 %	57 %	71 %

Conclusiones

20

Los grupos de vacunas en ambos niveles de exposición de S. Hadar no mostraron reducciones en comparación con los controles en la dispersión de cloaca (números dispersados y números de muestras positivas) o muestras de contenido cecal. Sin embargo, los grupos de vacuna en ambos niveles de exposición mostraron reducciones en la colonización de órganos con diferencias máximas observadas en el nivel de exposición más bajo (10² ufc) en el día 10 después de la exposición. Por lo tanto, se observó evidencia de protección cruzada contra una exposición de S. Hadar en pollos que habían sido inmunizados pasivamente contra S. Infantis, en términos de reducción de la colonización de órganos.

25

30

Los grupos de vacuna en ambos niveles de exposición de *Salmonella* Infantis mostraron poca reducción en comparación con los controles en las muestras de dispersión de cloaca o cecal. Se observó una reducción en la invasión de órganos con los grupos vacunados que mostraron menos muestras de órganos positivos que los controles con un patrón similar al observado con la exposición a S. Hadar.

Ejemplo 3**Pruebas de eficacia de una vacuna trivalente contra la exposición a S. Hadar en ponedoras a las 14 semanas de edad**

5

Sumario

10 Se inmunizaron pollos tipo ponedoras de origen SPF de seis semanas de edad con una vacuna trivalente que contenía cantidades iguales de células inactivadas con formalina de *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Infantis* que habían crecido bajo condiciones con restricción de hierro. Se administró una segunda dosis de vacuna a las 10 semanas de edad. Cuatro semanas después de la segunda vacunación, las aves y una cohorte no vacunada se expusieron por la vía oral a *S. Hadar*, y la dispersión de la cepa de exposición se controló mediante un examen con hisopo cloacal. La diseminación de las bacterias de exposición a los órganos internos se determinó mediante un examen post mortem de las aves a los 10 y 14 días posteriores a la exposición.

15

Hubo una cantidad significativamente menor de organismos de exposición eliminados del grupo vacunado cuando el nivel de dispersión individual de aves se comparó con el grupo de control ($p = 0,001$). La proporción de muestras positivas de bazo de aves de control fue significativamente mayor que el grupo vacunado ($p = 0,01$). No hubo recuperación del organismo de exposición del cultivo de hígado en este estudio.

20

La vacuna trivalente probada aquí ha demostrado eficacia contra la exposición a *S. Hadar* en que:

- El número de *S. enterica* de serovar Hadar en muestras de heces frescas de pollos vacunados después de la exposición en los diferentes días de muestreo fue menor en las aves vacunadas que en las de control para cada punto temporal muestreado; cuando se comparó la dispersión total con el tiempo, el número de organismos dispersados por las aves vacunadas fue significativamente menor que el de las aves de control.
- El número total de muestras positivas de bazo mostró una reducción significativa en las aves vacunadas en comparación con los controles.

25

Diseño experimental

30 Las aves ponedoras de origen SPF se criaron como un grupo en alojamientos convencionales de gallinas durante varias semanas para desarrollar una flora intestinal normal común, hasta la fase de exposición del estudio. Se vacunaron 55 aves a las 6 semanas de edad con 0,5 ml de vacuna administrada por vía intramuscular en el seno. Cuatro semanas después, se administró una segunda dosis de vacuna por la misma ruta. 52 aves permanecieron sin vacunar como grupo de control. Antes del momento de la administración de exposición, las aves se transfirieron a instalaciones de contención para ser alojadas en sus grupos separados en corrales.

35

40 Las aves se expusieron a la infección por exposición oral aproximadamente a las 14 semanas de edad con una exposición a *S. Hadar*. El alimento se retiró de las aves el día anterior a la exposición y luego se reintrodujo después de la exposición. El curso de la infección se controló mediante un examen con hisopo cloacal de las mismas 30 aves de cada grupo a los 3, 5, 7, 10 y 14 días después de la exposición. La presencia de la bacteria de exposición en muestras de hígado y bazo se determinó mediante el examen de muestras tomadas post mortem de las aves no seleccionadas para el muestreo cloacal, ya sea en el día 10 después de la exposición, o para las aves restantes a los 14 días después de la exposición. Los grupos de estudio fueron como se presentan en la Tabla 9.

40

45

Tabla 9: Grupos de estudio:

Grupo	No de aves	Vacuna	Dosis de exposición diana en 20 ml
1	55	Lote 29	10 ⁸ ufc/ave
2	52	Ninguno	

50 **Vacuna:** La vacuna contenía 1,5 x 10⁹ células de células con restricción de hierro, e inactivadas con formalina de cada uno de *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Infantis* y un adyuvante de hidróxido de aluminio. La vacuna había pasado una prueba de esterilidad y pruebas analíticas antes de su uso.

50

55 **Exposición:** Las aves se expusieron a 3,8 x 10⁸ ufc de *S. Hadar*, cepa PT16, recién preparada a partir de un cultivo nocturno a 37 °C en un entorno microaerófilo.

55

Los cultivos se concentraron 10 veces mediante centrifugación, y se verificó la viabilidad y la pureza mediante colocación en placas sobre agar sangre. La exposición se administró como una dosis oral de 20 ml por ave.

60 **Animales:** SPF White Leghorn Layers, de sexo mixto, de 6 semanas de edad en el momento de la primera vacunación.

60

Métodos y procedimientos

5 **Prueba de muestra ambiental:** Se analizaron muestras del lecho de paja para detectar la presencia de Salmonella en el momento de la vacunación y la exposición mediante la recolección de muestras de material fecal de al menos cinco lugares separados del suelo del corral en un recipiente estéril. El material fecal se suspendió en agua de peptona tamponada a una relación de heces a medio de 1:10 p/v y se incubó a 37 °C durante hasta 24 horas. Una muestra de 100 µl del crecimiento del caldo se inoculó en volúmenes de 10 ml de caldo Rappaport Vassiliadis (RV) y se incubó durante 72 horas a 42 °C. Se inoculó un bucle de cada caldo RV de crecimiento en un medio selectivo de Salmonella Brilliance™ (Oxoid), y se incubó durante 24 horas a 37 °C. La presencia de cualquier Salmonella se demostró mediante la presencia de colonias malvas. Las colonias sospechosas se confirmaron mediante identificación serológica. El aislamiento de Salmonella del medio ambiente habría invalidado el estudio.

15 **Serología:** Se tomaron muestras de sangre de la vena radial de cada ave de estudio antes de la exposición. Se analizaron las muestras de suero para detectar la presencia de anticuerpos contra *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* y *S. Infantis* utilizando un ELISA interno. El ensayo implicó la incubación de diluciones de sueros de prueba y de referencia en placas de microtitulación previamente recubiertas con flagelos preparados a partir de células de Salmonella del serovar relevante. Después del lavado, los anticuerpos unidos se detectaron usando un anticuerpo anti-IgY de pollo conjugado con peroxidasa, seguido de incubación con un sustrato. El desarrollo del color se detuvo con ácido y las densidades ópticas se leyeron a 450 nm. Los niveles de anticuerpos se calcularon en relación con el suero de referencia para cada serovar.

Aislamientos de Salmonella

25 Se examinaron hisopos cloacales y muestras post mortem de hígado y bazo para determinar la presencia de la bacteria de exposición como se describe en el Ejemplo 1.

30 **Análisis de los datos:** El número de *Salmonella* aislada por gramo de heces de hisopos cloacales se calculó a partir de aislamientos de cultivo directo. También se registró el número de muestras positivas de cada grupo después del enriquecimiento.

Se calcularon los medios geométricos de dispersión, los totales de muestras positivas y la dispersión total por ave. La dispersión total de cada ave en los grupos a lo largo de la duración del estudio se calculó usando una estimación de 'área bajo la curva' y los dos grupos se compararon usando una prueba t de dos muestras.

35 Las proporciones de aves con muestras positivas de bazo (tanto por cultivo directo como por enriquecimiento) se compararon utilizando tablas de contingencia (análisis de Chi cuadrado con corrección de continuidad de Yates), según corresponda. Los resultados para las muestras de hígado no se incluyeron ya que no se encontró que las muestras de hígado fueran positivas para Salmonella.

Resultados

45 **dispersión de la cepa de exposición Salmonella Hadar - Resultados del hisopo cloacal:** Se calcularon los números medios geométricos de *Salmonella* recuperados en cada punto temporal de los hisopos cloacales después de la exposición. Se calculó el log₁₀ del recuento por gramo de contenido cecal y se calculó la media para cada grupo en cada punto temporal (véase la Figura 4 y la Tabla 10).

50 En cada punto temporal hasta 14 días después de la exposición, hubo niveles medios más altos de recuperación del grupo de control en comparación con el grupo vacunado. En el día 14 después de la exposición, los números arrojados por ambos grupos fueron similares. Se calculó la dispersión total a lo largo del tiempo para cada ave y se demostró que había una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo vacunado (1) y el grupo control (2) (p = 0,001), en comparación con la prueba t.

Tabla 10: Comparación de la media geométrica log₁₀ de ufc/g recuperada de las aves vacunadas y de control a lo largo del tiempo.

Días después de la exposición	Media de Log ₁₀ de ufc/g	
	Vacunados (Grupo 1)	Controles (Grupo 2)
Día 3	3,09	4,97
Día 5	3,00	4,13
Día 7	2,00	2,65
Día 10	1,38	1,96
Día 14	1,10	1,31

55 **Aislamiento de S. Hadar post mortem:** En cada punto temporal hubo más muestras positivas de las aves no vacunadas, tanto de cultivo directo como en total, que del grupo vacunado.

A los 10 días después de la exposición, un total de 9 de 25 (36 %) muestras de bazo del grupo vacunado fueron positivas, 7 de ellas directas, en comparación con 16 de 22 (73 %) del grupo de control, de las cuales 11 fueron directas.

5 A los 14 días después de la exposición, un total de 8 de 30 (27 %) muestras del grupo vacunado fueron positivas, 4 de ellas directas, en comparación con 14 de 30 (47 %) cultivos del grupo de control, de las cuales 11 fueron directas (véase la Figura 2 y la Tabla 11).

10 **Tabla 11: Número de muestras positivas de bazo (cultivo directo y de enriquecimiento).**

Bazo Día 10 después de la exposición	Positiva	Negativa	Total
Grupo 1 - Vacunados	9	16	25
Grupo 2 - Controles	16	6	22
Bazo Día 14 después de la exposición	Positiva	Negativa	Total
Grupo 1 - Vacunados	8	22	30
Grupo 3 - Controles	14	16	30

No hubo recuperación del organismo de exposición por cultivo directo o de enriquecimiento a partir de muestras de hígado tomadas tanto 10 como 14 días después de la exposición.

15 Véase la Figura 5 para ver el porcentaje de muestras positivas totales de bazo (cultivo directo y de enriquecimiento) de los grupos 1 y 2, a los 10 y 14 días después de la exposición.

Los números de aves que producen una muestra positiva *post mortem* se resumen en la Tabla 12.

20 **Tabla 12: Resumen del número total de aves positivas post mortem (cultivo directo y de enriquecimiento).**

	Positiva	Negativa	Número total de aves muestreadas
Grupo 1 - Vacunados	17	28	55
Grupo 2 - Controles	30	22	52
Valor de chi cuadrado (correlación de Yates) = 6,736 (p = < 0,01)			

Conclusiones

25 El objetivo de este estudio fue demostrar la eficacia de una vacuna trivalente de Salmonella contra una infección heteróloga por exposición a S. Hadar.

30 La eficacia de la vacuna en la reducción de la dispersión se demostró de manera convincente ya que hubo significativamente menos organismos de exposición dispersados en las heces del grupo vacunado en comparación con el grupo control durante la duración del estudio (p = 0,001); comenzando en un nivel de dispersión 100 veces menor.

También se demostró una eficacia impresionante contra la diseminación a los órganos internos, ya que había significativamente menos aves del grupo vacunado que presentaban muestras positivas *post mortem* en comparación con los controles (p < 0,01); de hecho, los niveles de diseminación se redujeron a la mitad de manera eficaz.

35 Por consiguiente, la vacuna trivalente probada aquí dio como resultado una reducción significativa del número de S. Enterica en muestras de heces frescas de pollos vacunados en comparación con los controles, que permanecieron más bajos hasta el final de la prueba. Asimismo, el número de muestras positivas a Salmonella de hígado o bazo fue significativamente menor en los vacunados que en los controles.

40

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 para su uso en la protección de aves de corral contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3, **caracterizado por que** el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 está inactivado y se cultivó en un medio con restricción de hierro.
- 10 2. El serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, que se selecciona del grupo que consiste en *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Livingstone, *Salmonella* Mbandaka, *Salmonella* Montevideo, *Salmonella* Ohio, *Salmonella* Thompson y *Salmonella* Virchow.
- 15 3. El serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, **caracterizado por que** el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 es *Salmonella* Infantis.
- 20 4. El serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 3 en combinación con un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo B para protección adicional de aves de corral contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo B.
- 25 5. El serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, **caracterizado por que** el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo B es *S. Typhimurium*.
- 30 6. El serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 5 en combinación con un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo D para protección adicional de aves de corral contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo D.
- 35 7. El serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, **caracterizado por que** el serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo D es *S. Enteritidis*.
- 40 8. El serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** se administra a aves de corral en una primera vacunación seguida de una segunda vacunación.
- 45 9. Vacuna que comprende un serovar de *Salmonella enterica* del serogrupo C1 de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 8 para su uso en la protección de aves de corral contra un trastorno que surge de una infección por *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3, o de la infección por *Salmonella enterica* del serogrupo C2-3 y por *Salmonella enterica* del serogrupo C1.
10. Una vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la vacuna es una suspensión líquida de células inactivadas con formalina, y con restricción de hierro, de los serovares de *Salmonella enterica* Enteritidis, Typhimurium e Infantis.
11. Una vacuna para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 o 10, que incluye además el uso de una o más cepas de *rinotraqueitis* aviar, *de virus de la bronquitis infecciosa*, *de virus de la enfermedad de Newcastle* y *de virus del síndrome de caída de la puesta*.
12. Una vacuna para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 9 - 11, que comprende un adyuvante de hidróxido de aluminio.

Figura 1 A

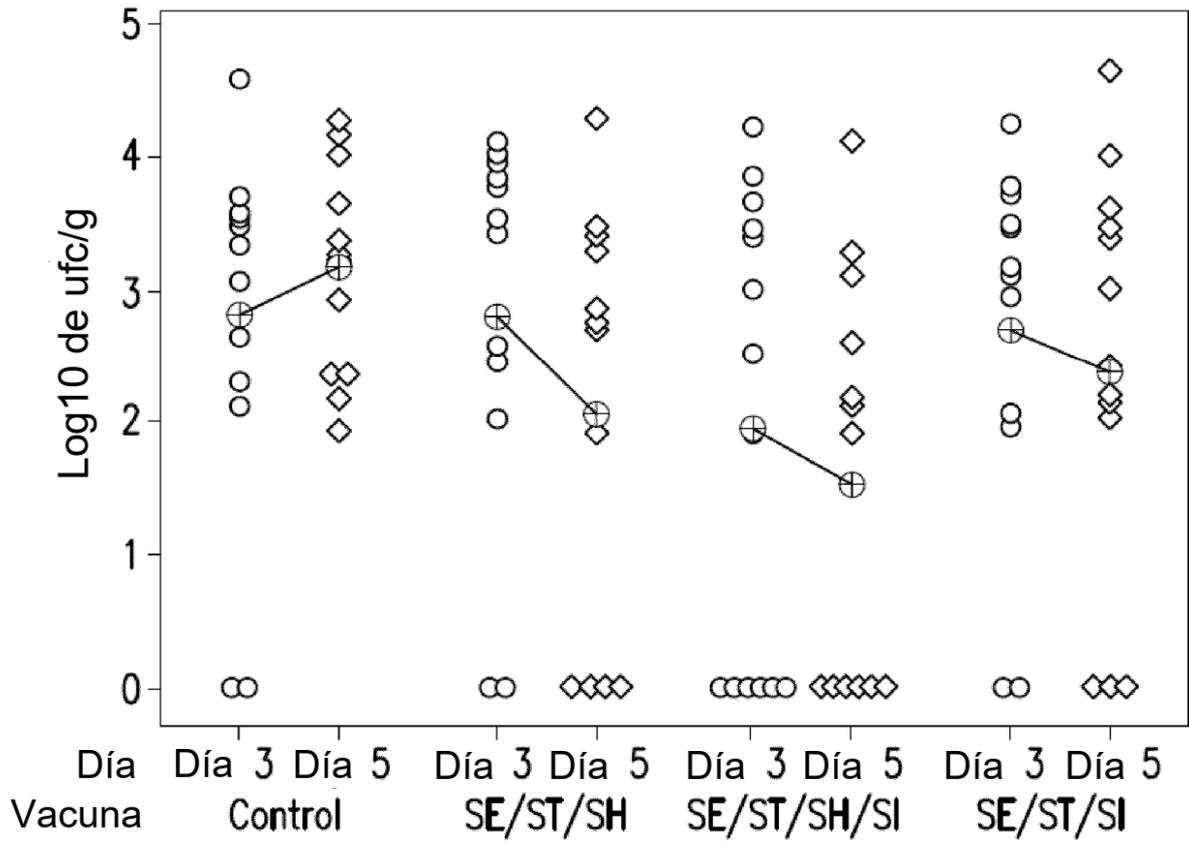


Figura 1 B

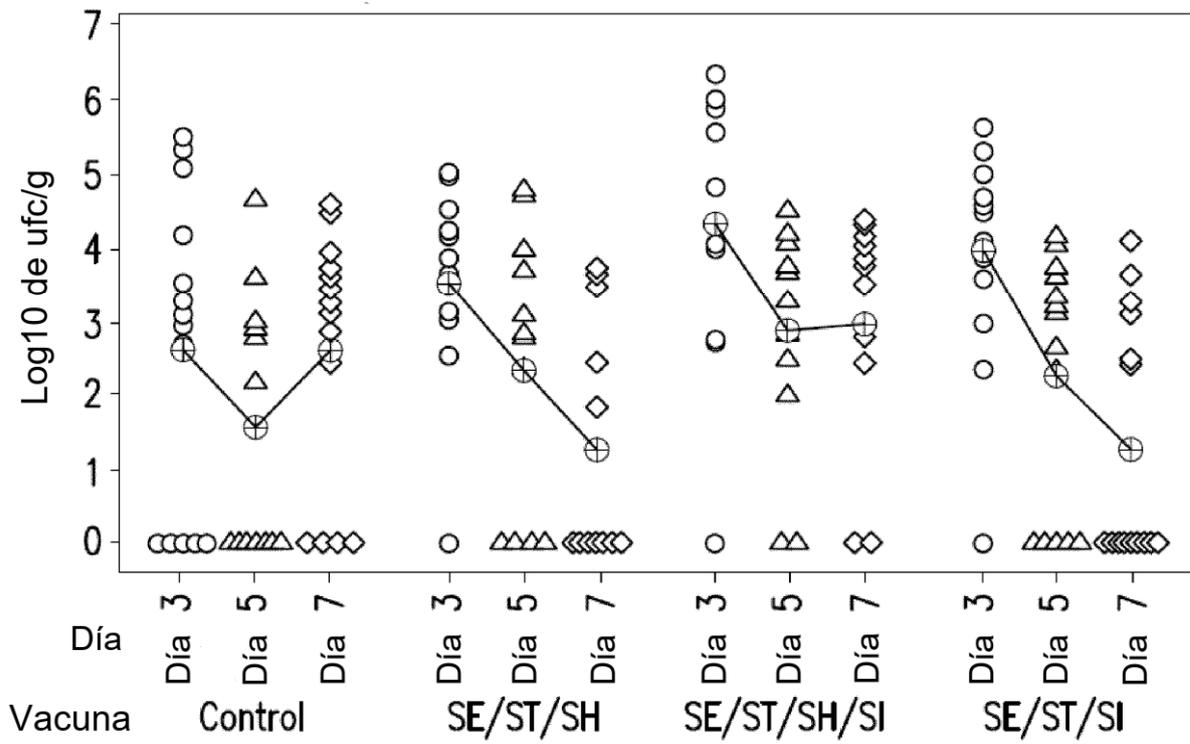


Figura 1 C

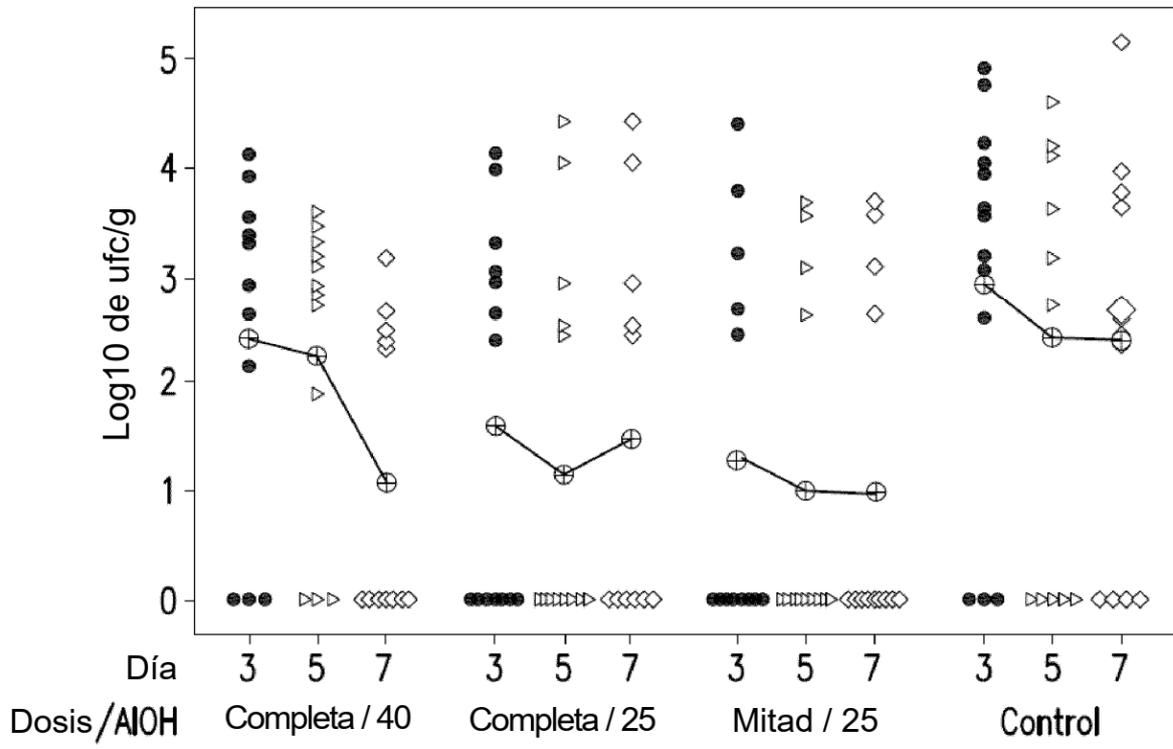
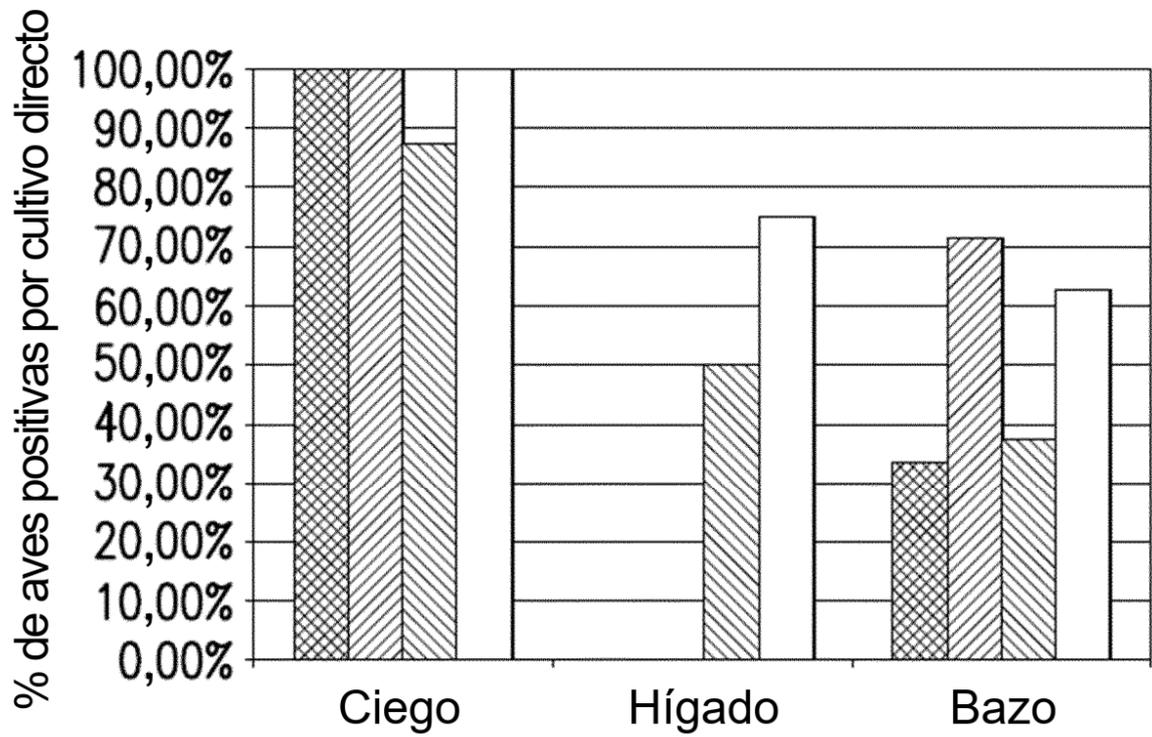


Figura 2 A



Leyenda de las sombras

- SE/ST/SH
- SE/ST/SI
- SE/ST/SH/SI
- Control

Figura 2 B

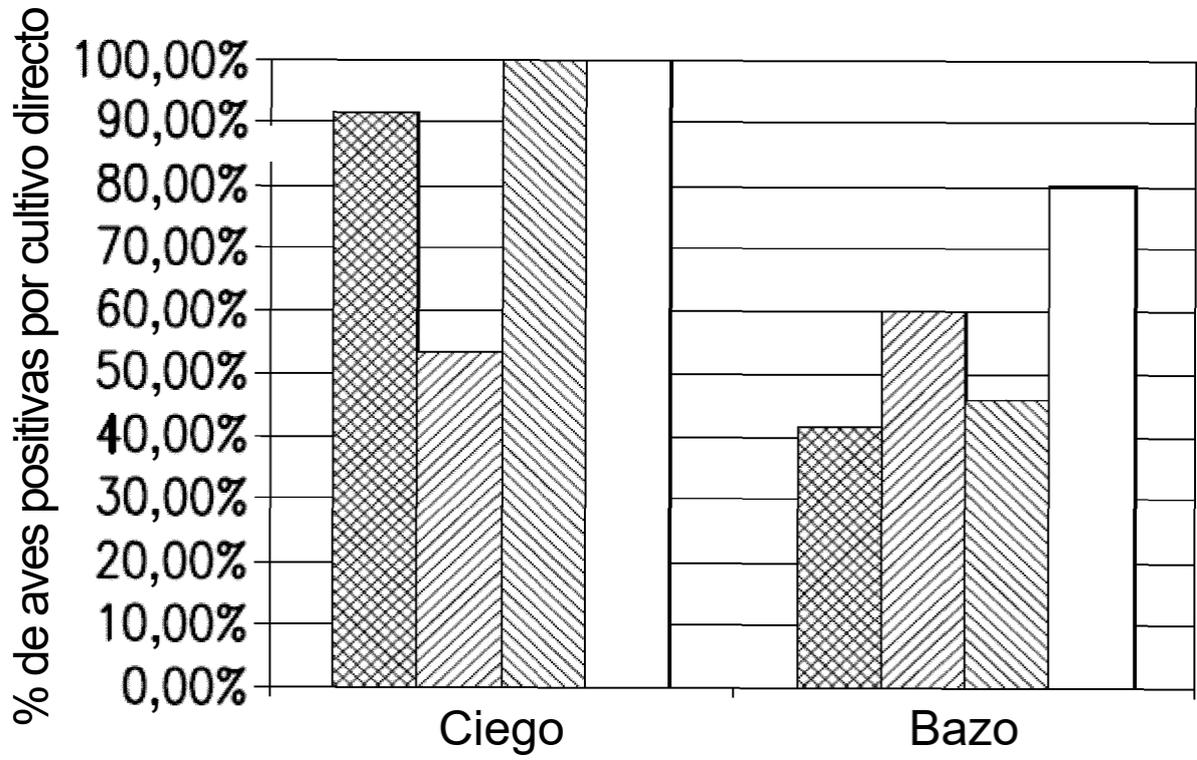


Figura 3 A

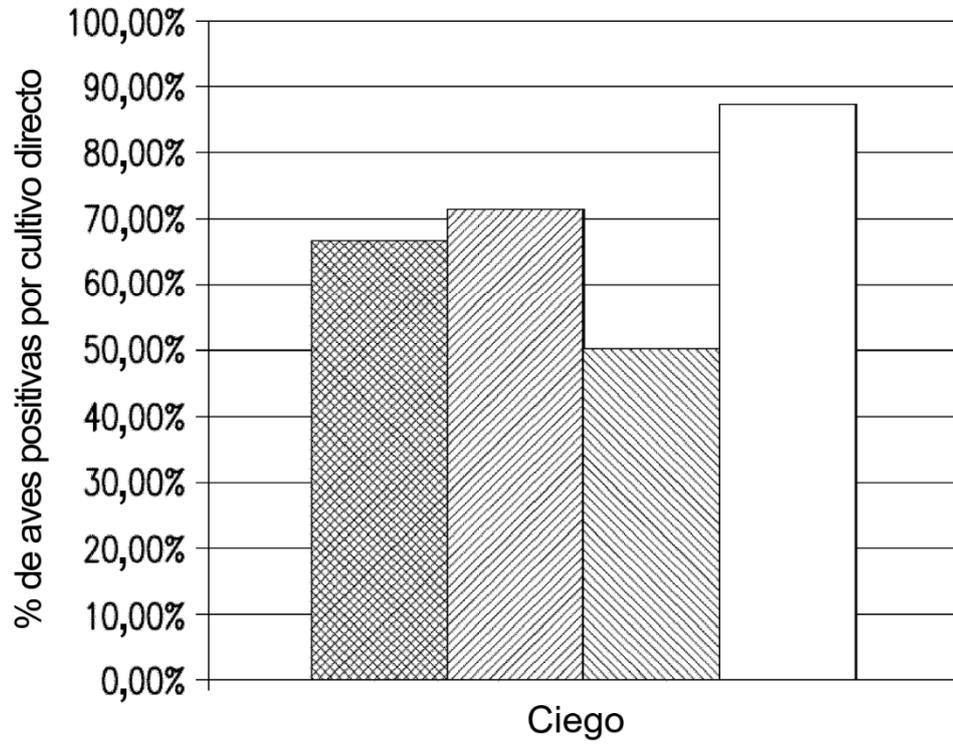


Figura 3 B



Figura 3 C

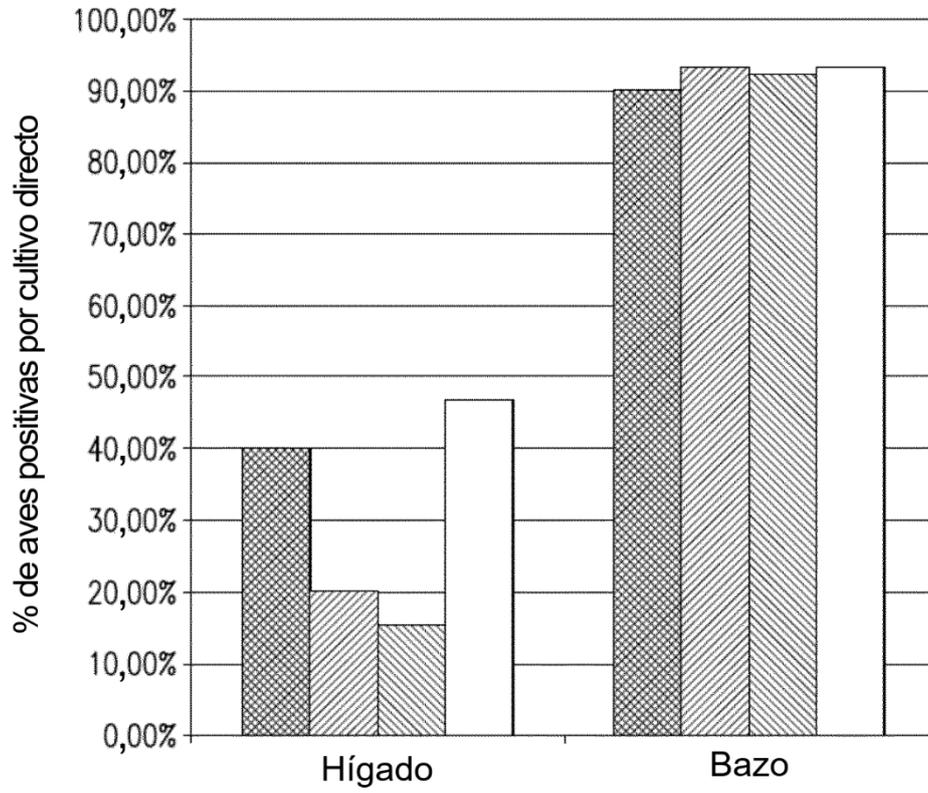


Figura 4

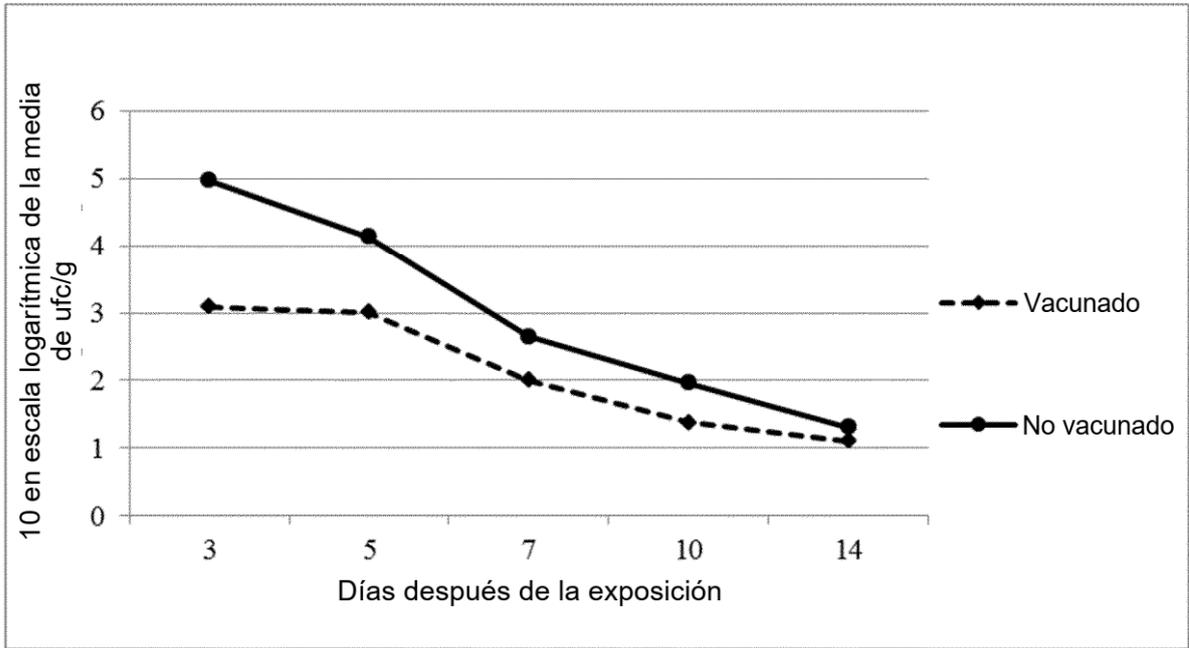


Figura 5

