

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 473**

51 Int. Cl.:

A61K 39/102 (2006.01)

A61K 39/295 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **17.03.2014** **PCT/EP2014/055244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14147001**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.03.2014** **E 14710302 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.12.2019** **EP 2976102**

54 Título: **Vacuna para proteger a un rumiante contra la neumonía causada por Mannheimia haemolytica**

30 Prioridad:

18.03.2013 EP 13159665

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

06.07.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

JACOBS, ANTONIUS ARNOLDUS CHRISTIAAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 771 473 T3

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

DESCRIPCIÓN

Vacuna para proteger a un rumiante contra la neumonía causada por *Mannheimia haemolytica*

- 5 La presente invención se refiere a una vacuna para su uso en un método para proteger a un rumiante contra la neumonía causada por la bacteria *Mannheimia haemolytica*.

Mannheimia haemolytica, en particular el serotipo A1, es un organismo comensal del tracto respiratorio superior de los rumiantes, en particular bovinos, y es el principal patógeno bacteriano asociado a la pasteurelosis neumónica (que es un término de uso habitual para hacer referencia a la neumonía inducida por *Mannheimia haemolytica*) que da lugar a lesiones pulmonares. Esta es una forma grave de la enfermedad que se desarrolla en el complejo de enfermedades respiratorias bovinas (Dagmara Kisiela et al. en Infect. Immun. 2009 January; 77(1): 446-455). Las bacterias habitualmente colonizan las vías respiratorias superiores (incluidas la cavidad nasal, la faringe y la laringe) sin causar ninguna reacción fisiológica, tal como una enfermedad o una respuesta inmunitaria contra estas bacterias. La inducción de la enfermedad a menudo se asocia a estrés, especialmente por el transporte o la infección con virus patógenos. La vacunación de animales con una vacuna que comprende bacterias *Mannheimia haemolytica* vivas o muertas (también conocidas como bacterias "MH"), como se conocen habitualmente en la materia, puede conferir cierta protección contra la enfermedad. No obstante, en los ensayos, con independencia del tipo de vacuna (organismos vivos o inactivados) y la vía de administración (subcutánea, intradérmica, intramuscular o intranasal), los resultados de la vacunación han sido variables. Desde hace 30 años o más, se han publicado diferentes estudios y artículos de revisión que describen todo tipo de vacunas y vías de administración para intentar e inducir protección contra la exposición a *Mannheimia haemolytica* de tipo salvaje.

En un artículo de revisión, Confer et al. (JAVMA, Vol. 193, n.º 10, November 15, 1988) se informa que los rumiantes vacunados con *Mannheimia haemolytica* por las vías de aerosol, ID (interdérmica) o SC (subcutánea) en algunos estudios proporcionó una reducción significativa ($p < 0,05$) de la lesión pulmonar tras la exposición transtorácica, pero en un estudio, la vacunación con bacterias vivas por la vía de aerosoles no indujo ninguna protección. Esto es coherente con Jericho et al. (Can. J. Comp. Med., 46: 287-292, July 1982), que informa sobre otro estudio que muestra que la vacunación con aerosoles con *Mannheimia haemolytica* vivas no proporcionará una protección adecuada. Del mismo modo, Confer (citado anteriormente), notifica que muchas vacunas con bacterina disponibles comercialmente solo inducen una reducción insignificante del número de lesiones. También afirma que un adyuvante de tipo oleoso mejora la protección. Su conclusión es que para obtener la máxima resistencia contra la neumonía, lo más probable es que sea necesaria una combinación de leucotoxina y componentes de la superficie bacteriana. En el documento US 5,256,415 se muestra que las bacterias *Mannheimia* vivas atenuadas cuando se administran mediante implante subcutáneo producen una respuesta humoral satisfactoria. Había protección real incluso cuando estaba presente un potenciador conocido de la pasteurelosis bovina (virus de la diarrea viral bovina). Sin embargo, cuando se administra por vía de aerosol, no se informa más que una respuesta inmunitaria. De Frank et al. (AJVR, Vol. 63, n.º 2, febrero de 2002), se sabe que tal respuesta después de la vacunación intranasal con una cepa viva atenuada puede producirse sin ningún efecto protector. Sin embargo, Frank et al., en un estudio adicional (AJVR, Vol. 64, n.º 5, mayo de 2003) observan cierto efecto relacionado con la protección después de la vacunación intranasal con bacterias *Mannheimia haemolytica* atenuadas vivas: la vacuna disminuyó la cantidad de colonización por *Mannheimia haemolytica* de tipo salvaje. Sin embargo, no se notificó reducción en las lesiones pulmonares.

Por lo tanto, parece ser difícil obtener protección real contra *Mannheimia haemolytica* (es decir, la reducción real en la consolidación de la lesión pulmonar) que puede deberse al hecho de que la enfermedad, pasteurelosis, es una enfermedad multifactorial.

El objetivo de la invención es, por tanto, proporcionar una vacuna que proteja a un rumiante contra la pasteurelosis neumónica causada por *Mannheimia haemolytica*, vacuna que es segura en animales jóvenes (menores de 3-4 semanas de edad). La protección contra la neumonía en este sentido es una reducción estadísticamente significativa real en las puntuaciones de las lesiones pulmonares ($p < 0,05$; preferentemente $p < 0,01$). Es preferente que además, se proporcione una reducción significativa en la pleuritis ($p < 0,05$; preferentemente $p < 0,01$) y, más preferentemente, una reducción significativa de la carga bacteriana en los pulmones ($p < 0,05$; preferentemente $p < 0,01$) después de la exposición a bacterias *Mannheimia haemolytica* patógenas.

Para este fin, se ha diseñado una vacuna que comprende en combinación las bacterias *Mannheimia haemolytica* vivas atenuadas, virus parainfluenza-3 vivos atenuados y virus sincitial respiratorio bovino vivos atenuados, en la que la vacuna es para administración a las vías respiratorias superiores del rumiante por atomización de la vacuna. Esto es, la vacuna se administra pulverizándola como una neblina de partículas finas que arrojan un diámetro medio promediado en volumen de menos de 200 μm , para llegar a las vías respiratorias superiores del rumiante. Se esperaba que la administración de las bacterias de *Mannheimia haemolytica* atenuadas en las vías respiratorias superiores fuera intrínsecamente segura, ya que incluso las bacterias de tipo salvaje generalmente no inducen enfermedad cuando están presentes en las vías respiratorias superiores. Sin embargo, no estaba previsto que se produjera una respuesta inmunitaria, y mucho menos una protección adecuada, contra la bacteria *Mannheimia haemolytica* de tipo salvaje mediante la administración de las bacterias atenuadas a las vías respiratorias superiores: incluso las bacterias de tipo salvaje cuando están presentes en esta parte de las vías respiratorias no inducen una

respuesta inmunitaria en circunstancias normales. Sorprendentemente, administrando las bacterias *Mannheimia haemolytica* vivas atenuadas a las vías respiratorias superiores mediante atomización en presencia del virus parainfluenza-3 vivo atenuado y el virus sincitial respiratorio bovino vivo atenuado, se induce una respuesta inmunitaria adecuada contra la bacteria *Mannheimia haemolytica*, respuesta que es adecuada para obtener protección real contra una exposición a bacterias de tipo salvaje. La razón de esto no está 100 % clara, pero puede estar relacionada con un doble efecto sinérgico de tener un área mucosa enorme en la que la vacuna se libera en la mucosa en combinación con la presencia de virus que desencadenan una respuesta inmunitaria en estas superficies mucosas. Aunque estos virus están atenuados y, por lo tanto, no inducen una enfermedad real, a saber, efectos patológicos en la mucosa de las vías respiratorias, la respuesta inmunitaria que producen, en combinación con la propagación de la vacuna mediante atomización, parece ser decisiva en la capacidad de la nueva vacuna para inducir una respuesta inmunitaria protectora real contra la bacteria *Mannheimia* presente en la vacuna.

Muchas cepas atenuadas de la bacteria *Mannheimia haemolytica* como tales son conocidas en la materia (véase, por ejemplo, Infection and Immunity, Vol. 86, No.7, julio de 2000, pág. 3916-3922; documentos US 8,183,026; US 2010/0104594 y US 2011/0212132). El tipo de atenuación no es importante para la invención como tal. La invención se refiere al sorprendente hallazgo de que una respuesta inmunitaria contra bacterias *Mannheimia haemolytica* vivas atenuadas que proporciona protección contra la bacteria *Mannheimia haemolytica* de tipo salvaje, se puede provocar incluso si estas bacterias se administran en las vías respiratorias superiores (donde *Mannheimia haemolytica* de tipo salvaje está presente como comensal y no induce una respuesta inmunitaria en absoluto), cuando la administración se realiza por atomización en presencia de los virus indicados anteriormente. Se entiende que el tipo de atenuación de las bacterias *Mannheimia haemolytica* puede afectar a la virulencia restante de la bacteria y, por lo tanto, a la seguridad y eficacia de la vacuna. Sin embargo, el equilibrio de la seguridad y la eficacia para encontrar la atenuación deseada no se refiere a el descubrimiento mencionado anteriormente de la presente invención. Del mismo modo, la cepa particular o el tipo de atenuación de las cepas de virus no es esencial para la presente invención: dado que los virus son (inherentemente) totalmente ajenos a la bacteria, la respuesta inmunitaria específica contra los virus simplemente no puede ser esencial para obtener mejor protección contra la bacteria. Parece que el simple hecho de que se induzca una respuesta inmunitaria (mucosa) sobre una superficie mucosa grande es importante para la presente invención. Muchos virus de parainfluenza-3 vivos atenuados y virus sincitiales respiratorios bovinos vivos que provocan una respuesta inmunitaria después de la administración en las vías respiratorias superiores son conocidos en la técnica, tal como, por ejemplo, por las vacunas comercialmente disponibles Inforce™ 3 (Pfizer Animal health), Nasalgen IP (Merck Animal Health), TSV-2™ (Pfizer Animal Health) y ONSET™ 5 (Merck Animal Health).

Se observa que la atomización puede realizarse no solo cuando la vacuna está en forma líquida (las partículas son gotas), sino también cuando la vacuna está en forma sólida (por ejemplo, un polvo o torta liofilizados de las cepas en un estabilizador), en cuyo caso la vacuna se puede extender como un polvo fino, normalmente una torta liofilizada en polvo de la bacteria en una matriz estabilizadora. Se estima que es práctico un límite inferior de las partículas atomizadas (al menos, el diámetro medio promediado en volumen) de 1 µm, ya que para obtener partículas más pequeñas puede ser necesario un alto aporte de energía que podría ser poco práctico.

La vacuna resultante es segura en terneros jóvenes (de menos de 3-4 semanas de edad) y protege contra la neumonía causada por la bacteria *Mannheimia haemolytica*, es decir, provoca una respuesta inmunitaria que proporciona una reducción estadísticamente significativa de las puntuaciones de las lesiones pulmonares (p <0,05). Además de esta protección contra la neumonía, la vacuna proporciona una reducción significativa en la pleuritis (p <0,05) y una reducción significativa en la carga bacteriana en los pulmones (p <0,05) después de la exposición a bacterias *Mannheimia haemolytica* patógenas.

Por tanto, en una realización adicional, la vacuna para su uso de acuerdo con la invención es para administración a bovinos, preferentemente a una edad de menos de 4 semanas.

También se desvela el uso de bacterias *Mannheimia haemolytica* vivas atenuadas en combinación con el virus parainfluenza-3 vivo atenuado y el virus sincitial respiratorio bovino vivo atenuado, para la fabricación de una vacuna que comprende tanto las bacterias como los virus, vacuna que tras la administración a las vías respiratorias superiores de un rumiante mediante atomización proporciona protección contra la neumonía causada por bacterias *Mannheimia haemolytica*. También se desvela un método para proteger a un rumiante contra la neumonía causada por bacterias *Mannheimia haemolytica*, comprendiendo el método administrar a las vías respiratorias superiores de dicho rumiante mediante atomización una vacuna que comprende combinados bacterias *Mannheimia haemolytica* vivas atenuadas, virus parainfluenza-3 vivo atenuado y virus sincitial respiratorio bovino vivo atenuado.

Se observa que Xue et al. en Vaccine 28 (2010) 3784-3792 describen una vacuna combinada MH-BRSV-Pi3 para aplicación intranasal. Sin embargo, Xue usa esta vacuna solo para verificar la protección contra los patógenos virales correspondientes. Aparentemente, consistente con el conocimiento general común, Xue no esperaba protección real contra *Mannheimia haemolytica* de tipo salvaje. Además, Xue no muestra ni sugiere la administración de la vacuna por atomización, y ciertamente no por atomización intranasal. Por el contrario. Xue et al. debe haber administrado su dosis de vacuna intranasal de 1 ml como una corriente de fluido sólido, que era el método común en la técnica anterior. Cuando Xue menciona la administración por pulverización, se refiere a la infección de exposición

a los dos virus que se probaron.

Además, Xue et al. no es una divulgación habilitante de una vacuna contra *M. haemolytica*, porque se conocen muy pocos detalles sobre estas bacterias o su uso, y lo más importante: cuando Xue sí hace referencia a la vacunación bacteriana (página 3791, columna de la derecha, primer párrafo completo), los resultados mencionados se indican como "datos no publicados".

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

Como es bien sabido en la técnica, la administración intranasal se define como la administración "a través de las estructuras nasales" (diccionario en línea Merriam-Webster (m-w.com); o como: administración en el interior de la nariz "(The American Heritage® Medical Dictionary, Houghton Mifflin Company).

En una realización, la atomización proporciona una niebla de partículas de vacuna que tienen un tamaño promedio de partícula (volumen) por debajo de 50 µm de diámetro. Se reconoce que al tener partículas más pequeñas, mayor es la superficie de la mucosa a la que se puede llegar directamente mediante la vacuna. Se cree que esto lleva a una respuesta inmunitaria mejorada. Se ha demostrado que un tamaño de partícula inferior a 50 µm es práctico y adecuado para provocar una respuesta inmunitaria. En una realización adicional, el tamaño promedio de partícula está entre 20 y 40 µm de diámetro. En otra realización, la vacuna comprende virus de la rinotraqueítis bovina infecciosa vivos atenuados. Se cree que esto aumenta aún más la adecuación de la respuesta inmunitaria contra *Mannheimia haemolytica* ya que este virus, incluso cuando está atenuado, se sabe que desencadena una respuesta inmunitaria de la mucosa.

Se observa que el término "vacuna" en el sentido de la presente invención es una constitución adecuada para la aplicación a un animal, comprendiendo uno o más antígenos en una cantidad inmunológicamente eficaz (es decir, capaz de estimular el sistema inmunitario del animal objetivo lo suficiente como para al menos reducir los efectos negativos de una exposición a los microorganismos de tipo salvaje), normalmente combinados con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un líquido que contiene agua, comprendiendo opcionalmente agentes inmunoestimulantes (adyuvantes), que, tras la administración al animal, induce una respuesta inmunitaria para tratar una enfermedad o trastorno, es decir, ayuda a prevenir, mejorar o curar la enfermedad o trastorno. En general, puede fabricarse una vacuna usando procedimientos conocidos en la técnica que comprenden básicamente mezclar los antígenos (o una composición que contiene los antígenos) con un vehículo farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, un vehículo líquido, tal como agua (opcionalmente tamponada), o un vehículo sólido tal como se usa habitualmente para obtener vacunas liofilizadas. Para una vacuna con microorganismos vivos, una cantidad inmunológicamente eficaz está, normalmente, entre 10^4 - 10^9 UFC/dosis para bacterias y entre 10^3 - 10^{10} DICT₅₀/dosis para virus, aunque dependiendo de la atenuación, la cantidad puede ser menor (para microorganismos menos atenuados) o más alta (para microorganismos más atenuados). Opcionalmente, se añaden otras sustancias, tales como adyuvantes, estabilizadores, modificadores de la viscosidad u otros componentes, dependiendo del uso previsto o de las propiedades deseadas de la vacuna. Para la vacunación son adecuadas muchas formas, en particular formulaciones líquidas (con antígenos disueltos, emulsionados o suspendidos; los volúmenes de administración típicos están entre 0,1 y 10 ml, preferentemente entre 0,2 y 5 ml, preferentemente 2 ml o menos) pero también pueden ser adecuadas las formulaciones sólidas, tales como polvos para dispositivos de atomización.

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

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

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

La invención se explicará adicionalmente en función de los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

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

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

Tabla 1 Tamaño medio de la gota con varias cánulas

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

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

Ejemplo 2

El objetivo de este experimento fue evaluar la eficacia de la vacunación intranasal con un dispositivo de atomización con una vacuna viva MH-BRSV-Pi3 en terneros de 2 semanas de edad contra la exposición a *Mannheimia haemolytica* M 7/2. La vacuna contiene *Mannheimia haemolytica* vivas (ΔiktA), BRSV vivos (la cepa "Jencine"; la misma cepa que en el producto "Jencine 4", disponible en Merck Animal Health, Summit, NJ, EE.UU.) y Pi3 vivos (la cepa "INT2"; la misma cepa que en el producto Bovilis® IBR-Pi3 vivos, disponible en MSD Animal Health, Boxmeer, Países Bajos).

Diseño experimental

Para el experimento se utilizaron veinte terneros de captura limpia y privados de calostro (2-3 semanas de edad el día de la vacunación). Se vacunó a diez terneros una vez por vía intranasal con la vacuna de MH-BRSV-Pi3 vivos y se dejaron diez terneros como controles no vacunados. Tres semanas después de la vacunación, se expuso a todos los terneros intratraquealmente a *Mannheimia haemolytica*. Durante 7 días después de la exposición, se observó que los terneros desarrollaban signos clínicos de enfermedad respiratoria. A los 7 días de la exposición (o antes en caso de signos clínicos graves), se sacrificó a los terneros y se realizó la necropsia, es decir, se examinaron en busca de lesiones pulmonares, pleuritis y carga bacteriana.

Vacuna

La vacuna se constituyó conforme a los siguientes compuestos:

- *Mannheimia haemolytica* Δikt4 liofilizada, cepa D153, serotipo A1, que no produce leucotoxina activa, en el estabilizador Rho BACF.
- cepa Jencine de BRSV vivos congelados, diluida a un título de $5,7 \log_{10}$ DICT₅₀ ml el día de la vacunación y se introdujeron en hielo, y
- cepa INT2 de Pi3 vivos congelados, diluida a un título de $5,7 \log_{10}$ DICT₅₀ ml el día de la vacunación y se introdujeron en hielo.

Justo antes de la vacunación, la torta de *Mannheimia haemolytica* liofilizada se disolvió en Unisolve para alcanzar $1,5 \times 10^8$ UFC ml. Los tres compuestos se mezclaron en volúmenes iguales. La vacuna se administró por vía intranasal en ambos orificios nasales (1 ml por orificio nasal) utilizando el dispositivo de atomización MAD. El título bacteriano en la vacuna se verificó inmediatamente después del uso (recuento de vida). El título fue $8,4 \times 10^7$ UFC por dosis de 2 ml.

Cultivo para exposición

Mannheimia haemolytica M7 2 (serotipo A1) se inoculó en agar sangre y se incubó 16 horas a 37 °C. Después, se inoculó un asa de inoculación en 100 ml de TSB y se incubó durante 4-5 horas a 37 °C. Este cultivo se diluyó, con el objetivo de 2×10^7 UFC ml. El título real del cultivo de exposición se verificó mediante recuento en placa. El título

parecía ser $2,4 \times 10^7$ UFC por ml.

Vacunación

- 5 Los terneros se dividieron en dos grupos de 10 animales. El grupo 1 se vacunó una vez por vía intranasal con 2 ml (1 ml por orificio nasal) usando una jeringa equipada con el dispositivo MAD. El grupo 2 se dejó como control no vacunado. Los vacunados y los controles se alojaron en habitaciones compartimentos separados.

Prueba de provocación

- 10 Tres semanas después de la vacunación, todos los terneros se expusieron por vía intratraqueal a 30 ml de cultivo de exposición con el objetivo de una dosis de exposición de aproximadamente 6×10^8 UFC por animal. La dosis de exposición real fue de 7×10^8 UFC.

Exploración clínica

Después de la vacunación, los terneros fueron observados diariamente para detectar cualquier anomalía en el estado de salud general y o el comportamiento.

Exploración *post-mortem*

- 25 Siete días después de la exposición o antes en caso de signos clínicos graves, se sacrificó a los terneros por sedación eléctrica y después se exanguinaron hasta la muerte, seguida inmediatamente de un examen *post-mortem* con especial atención a los pulmones. Para cada uno de los seis lóbulos pulmonares, se estimó y registró el % de consolidación. La puntuación pulmonar total se obtuvo mediante la adición del % de consolidaciones pulmonares de los lóbulos pulmonares individuales (y, por lo tanto, en teoría está entre 0 y 600). La consolidación pulmonar es representativa de neumonía.

- 30 Para cada lóbulo pulmonar, la pleuritis fibrinosa se calificó como ausente (0), leve (1), moderada (2) o grave (3) y se registró.

- 35 Con respecto al aislamiento de *M. haemolytica* de las muestras *post-mortem*, se extirparon muestras de tejido de ocho sitios estándar representativos de los lóbulos de cada mitad del pulmón (4 sitios por mitad); el tejido enfermo se seleccionó, preferentemente, para cada sitio, si estaba presente. Las muestras de imagen especular (las dos muestras del lóbulo equivalente en cada mitad) se combinaron para obtener 4 muestras por ternero. Cada muestra combinada se sumergió en agua hirviendo durante 3 segundos, se homogeneizó, se diluyó en serie 10 veces y se inoculó (100 µl) en placas de agar sangre y, a continuación, se incubó durante 16-24 horas a 37 °C.

Análisis estadístico

- 40 Las puntuaciones de las lesiones pulmonares (% de consolidación) y las puntuaciones de pleuritis se evaluaron mediante ecuaciones de estimación generalizadas (GEE, Agresti, 2002), teniendo en cuenta la estructura de medición repetida de los datos. El porcentaje de consolidación pulmonar se convirtió en clases 0 % = 0, > 0 % a ≤ 5 % = 1, > 5 % ≤ 10 % = 2 y, a continuación, cada 10 % aumenta un incremento de 1 unidad. El ANOVA evaluó los
45 datos de reaislamiento para mediciones repetidas que explican la correlación en las mediciones de las partes del pulmón en un animal.

- 50 Todos los parámetros se probaron de forma bilateral con el nivel de significancia (α) establecido en 0,05. El análisis estadístico se realizó en el programa estadístico SAS V9.1 (SAS Institute Inc. Cary NC, EE.UU.).

Resultados

- 55 Después de la vacunación (hasta la exposición), todos los terneros se mantuvieron en buen estado de salud y no se observaron anomalías relacionadas con la vacuna (datos no mostrados). Después de la exposición, los terneros de control desarrollaron signos claros de enfermedad respiratoria, mientras que los terneros vacunados desarrollaron muchos menos signos. Un ternero de control se encontró muerto el día 2 después de la exposición y tres terneros de control tuvieron que ser sacrificados el día 1 o 2 después de la exposición debido a signos clínicos severos. Ninguno de los terneros vacunados murió o tuvo que ser sacrificado.

Post-mortem

Consolidaciones pulmonares

- 65 Las consolidaciones pulmonares en los vacunados se redujeron significativamente (74 %) en comparación con los controles: 40 frente a 152 ($p = 0,0015$, GEE). De los 10 animales vacunados, 7 presentaron una consolidación pulmonar inferior a 30 (lo que significa menos de aproximadamente 5 % de consolidación por lóbulo), uno tenía una

puntuación de 45 y dos animales tenían una puntuación de consolidación de 125 y 175 respectivamente, lo que dio como resultado el valor medio de 40. De los animales de control, todos tenían una puntuación superior a 40 y siete tenían una puntuación superior a 100.

5 *Pleuritis*

Las puntuaciones de pleuritis en los vacunados se redujeron significativamente (95 %) en comparación con los controles: 0,1 frente a 2,0 ($p = 0,0040$, GEE). En efecto, apenas se pudo detectar pleuritis en los animales vacunados. Incluso en los dos animales vacunados que tuvieron una puntuación de consolidación de 125 y 175 respectivamente, no se pudo detectar pleuritis.

Re-aislamiento bacteriano de M. haemolytica de los pulmones

La carga bacteriana en los vacunados fue significativamente menor (aproximadamente $5 \log_{10}$) en comparación con la de los controles: $2,4 \log_{10}/\text{ml}$ frente a $7,1 \log_{10}/\text{ml}$ ($p=0,0001$, mediciones repetidas de ANOVA). Esta reducción notable de la carga bacteriana corresponde, de hecho, a los efectos significativos observados con respecto a la consolidación pulmonar y la pleuritis.

Se cree que el efecto global contra la infección con *Mannheimia haemolytica* es notablemente mejor que lo que se conoce de la técnica anterior, ya que no solo la consolidación pulmonar se reduce en un 74 %, la pleuritis está prácticamente en cero y la carga bacteriana ha disminuido en casi cinco órdenes.

REIVINDICACIONES

1. Vacuna para su uso en un método para proteger a un rumiante contra la neumonía causada por la bacteria *Mannheimia haemolytica*, comprendiendo la vacuna en combinación bacterias *Mannheimia haemolytica* vivas atenuadas, virus parainfluenza-3 vivo atenuado y virus sincitial respiratorio bovino vivo atenuado, en donde la
5 vacuna es para administración a las vías respiratorias superiores del rumiante por atomización intranasal de la vacuna, y por lo que la protección es una reducción en las puntuaciones de lesión pulmonar.
2. Vacuna para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** la atomización proporciona una
10 neblina de partículas de vacuna que tienen un tamaño promedio por debajo de 50 µm de diámetro.
3. Vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** el tamaño promedio de partícula está entre 20 y 40 µm de diámetro.
4. Una vacuna para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que**
15 comprende virus de la rinotraqueítis infecciosa bovina vivos atenuados.
5. Bacterias *Mannheimia haemolytica* vivas atenuadas, en combinación con el virus parainfluenza-3 vivo atenuado y el virus sincitial respiratorio bovino vivo atenuado, para su uso en un método para proteger a un rumiante contra la
20 neumonía causada por la bacteria *Mannheimia haemolytica*, comprendiendo el método la administración de una vacuna, que comprende bacterias *Mannheimia haemolytica* vivas atenuadas, virus parainfluenza-3 vivo atenuado y virus sincitial respiratorio bovino vivo atenuado, a las vías respiratorias superiores del rumiante por atomización intranasal de la vacuna, y por lo que la protección es una reducción en las puntuaciones de lesiones pulmonares.