

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 282**

51 Int. Cl.:

A61K 39/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.02.2016 PCT/EP2016/052239**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.08.2016 WO16124623**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.02.2016 E 16703486 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 3253410**

54 Título: **Una vacuna para usar contra la infección asintomática por Lawsonia en un cerdo**

30 Prioridad:

04.02.2015 EP 15153782

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

10.12.2020

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)
Wim de Körverstraat 35
5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

JACOBS, ANTONIUS, ARNOLDUS, CHRISTIAAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 798 282 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

Una vacuna para usar contra la infección asintomática por *Lawsonia* en un cerdo

5 **Campo general de la invención**

La presente invención se refiere a una vacuna para usar en un método para reducir en un cerdo la diseminación de bacterias *Lawsonia intracellularis* asociada a la infección asintomática con *Lawsonia intracellularis*.

10 **Antecedentes de la invención**

La enteropatía proliferativa, también conocida como ileítis, es una enfermedad entérica común de los cerdos posdestetados en todo el mundo, causada por la bacteria intracelular estricta *Lawsonia intracellularis*. La lesión característica es una proliferación de enterocitos inmaduros en las criptas ileales intestinales; estas células generalmente contienen las bacterias patógenas dentro de su citoplasma apical. En la autopsia, las lesiones histológicas se pueden confirmar como positivas para *Lawsonia* mediante la visualización de bacterias con forma vibrioide de 1,5 - 2,5 µm de largo, especialmente en enterocitos, pero también a menudo dentro de los macrófagos ubicados en la lámina propia entre las criptas y en los ganglios linfáticos mesentéricos. La eliminación de las bacterias de los enterocitos conduce a la resolución de las lesiones proliferativas asociadas, lo que indica un efecto local directo de las bacterias en las criptas (McOrist et al., Developed and resolving lesions in porcine proliferative enteropathy: possible pathogenetic mechanisms, Journal of Comparative Pathology, 115, 1996, pág. 35-45). La presencia de *Lawsonia intracellularis* en estas lesiones se ha demostrado mediante PCR, tanto en animales que manifiestan enfermedad (es decir, muestran diarrea o heces alquitranadas rojo-negras anormales, que pueden provocar la muerte) como en animales que manifiestan solo infección asintomática (que no muestran diarrea o heces anormales). Los casos sintomáticos generalmente están presentes en el período de crecimiento-terminación; en algunos cerdos de terminación de mayor edad se ha registrado una forma hemorrágica aguda.

La relación entre los cerdos seropositivos para *Lawsonia intracellularis* y la proporción de cerdos que presentan infección sintomática o asintomática se ha estudiado anteriormente (Van der Heijden, Prevalence of exposure and infection of *Lawsonia intracellularis* among slaughter-age pigs., Res Vet Sci, diciembre de 2004, 77(3), pág. 197-202). Parece que algunos cerdos podrían ser portadores, es decir, están infectados pero no presentan signos sintomáticos de ileítis. En particular en Europa, los animales que se consideran libres de enfermedad, parecen tener infecciones asintomáticas, como lo demuestran los restos de las bacterias en los intestinos en el sacrificio. Una explicación de los resultados positivos con respecto a la presencia de bacterias *Lawsonia intracellularis* en piaras libres de enfermedades sintomáticas es que esas piaras tienen *Lawsonia intracellularis* moviéndose a través de sus grupos de terminación. Solo en determinadas situaciones, la infección por *Lawsonia* produce problemas sintomáticos, incluyendo casos de enteropatía hemorrágica aguda.

En las piaras libres de enfermedades sintomáticas, la vacunación contra la infección por *Lawsonia* es poco frecuente. Sin embargo, dado que se sabe que la infección asintomática puede tener un impacto negativo en el aumento de peso diario promedio (ADWG, por sus siglas en inglés) de un cerdo, algunas granjas de producción y engorde utilizan la única vacuna comercial contra la ileítis en el mercado, es decir, Enterisol® Ileitis (comercializado por Boehringer Ingelheim), para combatir la infección local en los intestinos. Esta vacuna contiene bacterias *Lawsonia intracellularis* vivas atenuadas y se administra por vía oral. De hecho, en la actualidad se cree que una infección local del intestino solo se puede combatir mediante la inducción de inmunidad local. Esto es diferente para los animales que presentan enfermedad sintomática. Se ha demostrado (documento WO 2009/144088, asignado a Intervet International BV) que esos animales pueden protegerse con éxito mediante la vacunación sistémica con una vacuna no viva. Sin quedar ligados a teoría alguna, se cree que la razón de esto es que esos animales tienen lesiones gastrointestinales graves que exponen la infección al sistema, lo que explicaría por qué una respuesta inmunitaria sistémica ayudaría a combatir la infección. Sin embargo, cuando solo hay una infección asintomática, correspondiente a una infección local menor del intestino, se cree que se necesita una respuesta inmunitaria local que incluya IgA e inmunidad celular para combatir la infección. Para esto se necesita una vacuna que comprenda bacterias vivas, administrada de manera local. Esto se confirma en el documento de Mike Roof titulado The Research and Development of Enterisol® Ileitis, presentado en el Simposio europeo Enterisol® Ileitis, del 13 al 15 de octubre de 2005, Barcelona, España. En la página 2 se indica en la Tabla 1.1 que, aunque una vacuna inactivada administrada por vía sistémica podría inducir "inmunidad humoral/sistémica", no puede inducir tanto "inmunidad de la mucosa" como "inmunidad mediada por células". Las dos últimas se conocen comúnmente como necesarias para combatir una infección local del intestino con patógenos intracelulares (Ivan Roitt, Essential Immunology, séptima edición, 1991, páginas 206 "The secretory immune system protects the external mucosal surfaces", 209 "Defence is by cell-mediated immunity" y 210 "Activated macrophages kill intracellular parasites"). En el artículo de Mike Roof de 2005 se afirma que "Las primeras investigaciones sobre el prototipo bacteriano inactivado confirmaron ... que las vacunas inactivadas no proporcionaron una respuesta protectora contra ... la colonización del intestino." (página 2, columna izquierda, segundo párrafo completo).

65 La vacuna viva Enterisol® Ileitis está autorizada con una reivindicación para reducir la pérdida de aumento peso asociada a la infección, y se usa para ese propósito. Las desventajas de esta vacuna son que debe administrarse de

manera oral, que no es una forma rutinaria de vacunar a los cerdos, y que uno tiene que interrumpir el uso de antimicrobianos en los animales durante seis días (ya que de lo contrario las bacterias en la vacuna podrían ser eliminadas). Otra desventaja es que la vacuna no tiene licencia para la reducción de la diseminación de las bacterias. Aparentemente, los datos utilizados para la autorización de comercialización no mostraron una reducción en la diseminación de las bacterias. Una publicación reciente (Riber et al. en *Vaccine* 33, 2015, 156-162) confirmó que la Enterisol® Ileitis no proporciona ninguna protección contra la diseminación de bacterias *Lawsonia* después de la infección. Esto podría indicar que una infección con *Lawsonia intracellularis* en una piara de animales podría permanecer aunque todos los animales estén vacunados y los problemas de aumento de peso y las manifestaciones sintomáticas se reduzcan significativamente.

Objetivo de la invención

Es un objetivo de la invención proporcionar una vacuna mejorada que se pueda usar para reducir la diseminación de bacterias *Lawsonia intracellularis* por cerdos infectados de manera asintomática. Es un objetivo adicional proporcionar una vacuna mejorada que además proporcione una reducción del impacto negativo sobre ADWG asociado a la infección asintomática.

Sumario de la invención

Con el fin de cumplir con el objetivo principal de la invención, se ha diseñado una composición farmacéutica como se describe en la sección CAMPO GENERAL DE LA INVENCION aquí arriba, en donde esta composición comprende antígeno de *Lawsonia intracellularis* no vivo y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y es adecuada para administración sistémica.

Sorprendentemente, aunque los antígenos de *Lawsonia* no vivos administrados por vía sistémica (tales como los diferentes tipos de antígenos de *Lawsonia* no vivos como se describe en el documento WO2009/144088) se entienden comúnmente como incapaces de inducir IgA e inmunidad celular, y mucho menos afectar una respuesta inmunitaria local en el intestino, se descubrió que dicha composición puede reducir sustancialmente la diseminación de *Lawsonia intracellularis* en cerdos infectados de manera asintomática, o incluso evitar por completo que ocurra la diseminación. La razón de esto no está clara. Las ventajas de la nueva composición frente a la vacuna viva, como se conoce en la técnica, son claras: la nueva composición se puede administrar por vía sistémica, por ejemplo, por vía intramuscular o intradérmica, y dado que comprende solo antígenos de *Lawsonia* no vivos, no es necesario interrumpir el uso de antimicrobianos.

Definiciones

Una *vacuna* es una preparación que protege contra una infección posterior a la vacunación con un microorganismo patógeno, es decir, una preparación que evita o reduce la infección por el microorganismo, o un trastorno que resulta de la infección, normalmente mediante la interferencia con el propio microorganismo, por ejemplo, a través de anticuerpos, en el hospedador vacunado. De este modo, la vacunación evita, o al menos disminuye, el nivel de infección y/o evita, o al menos disminuye, el nivel del trastorno resultante de esa infección.

El *antígeno no vivo* de una bacteria de tipo silvestre es cualquier sustancia o compuesto, que no sea la bacteria viva como tal, contra el cual se debe generar una respuesta inmunitaria, de modo que la bacteria virulenta correspondiente o uno o más de sus factores de virulencia sean reconocidos por el sistema inmunitario del hospedador como resultado de esta respuesta inmunitaria y, al menos parcialmente, neutralizados. Los ejemplos típicos de antígeno no vivo de una bacteria de tipo silvestre son bacterias de célula completa inactivadas, subunidades de la bacteria, tales como proteínas expresadas en superficie, y toxinas. Las dos últimas pueden o no expresarse de forma recombinante. Con respecto a *Lawsonia intracellularis*, se conocen varios tipos de antígeno no vivo en la técnica, y se conocen, por ejemplo, de los documentos WO2009/144088 (célula completa inactivada), WO2005/070958 (subunidades) y WO97/20050 (célula completa inactivada).

Un *vehículo farmacéuticamente aceptable* es un medio biocompatible, a saber, un medio que después de la administración no induce reacciones adversas significativas en el animal sujeto, capaz de presentar el antígeno al sistema inmunitario del animal sujeto después de la administración de la vacuna. Dicho vehículo puede ser un líquido que contiene agua y/o cualquier otro disolvente biocompatible, pero también puede ser un sólido como el utilizado comúnmente para obtener vacunas liofilizadas (a base de azúcares y/o proteínas).

Una *infección asintomática* con *Lawsonia intracellularis* es una infección que es casi o completamente asintomática (sin signos ni síntomas), en particular, que no muestra diarrea o heces anormales. El animal infectado de manera asintomática es, por lo tanto, un portador asintomático de la bacteria intestinal *Lawsonia intracellularis*, pero puede estar asociado a un aumento de peso reducido. La existencia de la infección asintomática se identifica mediante el cultivo microbiológico de las heces o los intestinos (este último después del sacrificio), o técnicas de ADN tales como la reacción en cadena de la polimerasa de los mismos.

La *administración sistémica* de un antígeno significa que el antígeno se administra de tal manera que llega al

sistema circulatorio del cuerpo (este sistema comprende el sistema cardiovascular y linfático), afectando así al cuerpo como un todo en lugar de un locus específico tal como el tracto gastrointestinal. La administración sistémica se puede realizar, por ejemplo, mediante la administración de los antígenos en el tejido muscular (intramuscular), en la dermis (intradérmica), debajo de la piel (subcutánea), debajo de la mucosa (submucosa) y en las venas (intravenosa).

El *período de terminación* de un cerdo es el período en donde el cerdo tiene entre aproximadamente 10 semanas de edad (que tiene un peso de aproximadamente 25-30 kg) y aproximadamente 28 semanas de edad (que tiene un peso de aproximadamente 110-130 kg). El período de terminación es parte del período total de producción, es decir, el período entre el destete (aproximadamente 3 semanas de edad) y las 28 semanas de edad, la edad a la que se sacrifica a la mayoría de los cerdos.

Una composición que comprende *bacterias de célula completa inactivadas* como antígeno, comprende antígeno procedente de la inactivación de bacterias vivas de célula completa. Esto no excluye que las células bacterianas se rompan, al menos en parte, durante el proceso de inactivación, o que un extracto u homogeneizado de las células completas inactivadas se proporcione realmente como el antígeno en la "vacuna que comprende las bacterias de célula completa inactivadas" en el sentido de la presente invención. Las bacterias *Lawsonia intracellularis* de célula completa inactivadas se conocen, por ejemplo, de los documentos WO2009/144088 y WO97/20050.

Realizaciones

En una primera realización, el método es para evitar la diseminación de las bacterias. Parece que la vacuna actual, aunque se administra por vía sistémica, es capaz incluso de evitar la infección en más de un 90 %, incluso hasta un 99 % de los animales. Esto es muy sorprendente dado el hecho de que la vacuna viva Enterisol® Ileitis, que puede inducir una respuesta inmunitaria local en el intestino y, por lo tanto, debe adaptarse para combatir una infección asintomática en el intestino, ni siquiera es capaz de *reducir* simplemente la diseminación de las bacterias *Lawsonia*.

En una siguiente realización, el método además es para reducir el impacto negativo en el aumento de peso diario promedio (ADWG) del cerdo asociado a la infección asintomática con *Lawsonia intracellularis*. Parecía que la vacuna actual es capaz de afectar positivamente el ADWG de los cerdos afectados de manera asintomática. Este es un parámetro muy importante para cualquier criador de cerdos, incluso si la diferencia positiva en el aumento de peso es solo pequeña.

En otra realización, la vacuna se administra solo una vez. Una sola administración de la vacuna ha demostrado ser eficaz. Una segunda dosis de la vacuna, normalmente administrada 2-4 semanas después de la primera dosis, podría mejorar el nivel de la respuesta inmunitaria.

En otra realización, la vacuna se administra cuando el cerdo tiene 3-10 días de edad. Mediante la vacunación de los cerdos a esta temprana edad, se puede proporcionar protección temprana, es decir, protección directamente después del destete.

En otra realización más, el antígeno de *Lawsonia intracellularis* no vivo comprende los hidratos de carbono que en bacterias *Lawsonia intracellularis* vivas están asociados a la membrana celular externa de estas bacterias. Estos hidratos de carbono han demostrado ser capaces de elevar una respuesta inmunitaria específica contra *Lawsonia intracellularis* (véase el documento WO 2009/144088).

En otra realización más, el antígeno de *Lawsonia intracellularis* no vivo es antígeno purificado a partir de una composición que comprende bacterias *Lawsonia intracellularis* inactivadas. Mediante la purificación, el material bacteriano no específico se puede eliminar a partir del antígeno observado, por ejemplo, para reducir, si está presente, cualquier reacción en el sitio.

En una realización práctica, el antígeno de *Lawsonia intracellularis* no vivo es *Lawsonia intracellularis* de célula completa inactivada.

Ejemplos

ESTUDIO 1

Diseño del estudio 1

El estudio se llevó a cabo en una piara holandesa con una infección por *Lawsonia intracellularis* (LI) en cerdos de terminación de mayor edad y cerdas reproductoras. El estudio siguió un diseño aleatorizado, controlado y enmascarado.

Ciento cincuenta y ocho lechones de 3-10 días de edad (la mayoría de ellos de 3-5 días de edad) se asignaron aleatoriamente, dentro de las camadas, al grupo de prueba o de control. Los lechones en el grupo de prueba se

vacunaron con la vacuna bacteriana inactivada de Lawsonia en una emulsión de aceite en agua (véase el documento WO 2009/144088, Ejemplo 3) al ingreso y nuevamente 3 semanas después. Los lechones en el grupo de control recibieron una inyección de placebo (emulsión sin antígeno) en los mismos días. No se permitió la medicación de grupo con antibióticos que fuera eficaz contra *LI* (por ejemplo, tilosina, lincomicina, tiamulina, tetraciclinas) en los animales de estudio.

Después del destete, es decir, en la fase de cría y terminación, los lechones del grupo de prueba y de control se mantuvieron juntos. Además, durante la cría y el engorde, los cerdos no experimentales se alojaron en las mismas salas pero en corrales diferentes que los animales experimentales.

Los lechones se verificaron rutinariamente para detectar reacciones locales y sistémicas a las 4 horas, 1 día, 3 días, 1 semana y 2 semanas después de cada vacunación.

De todas las heces de cerdo, se tomaron muestras a intervalos de una o dos semanas durante el período de exposición esperada a una infección presentada. Por grupo de tratamiento, las muestras de heces de diez animales se agruparon y analizaron para detectar la presencia de bacterias *LI* mediante PCRc (en adelante, también denominada "PCR"). Si una muestra de heces agrupadas indicaba la presencia de bacterias, las muestras originales de ese grupo se analizaron individualmente. Tan pronto como las primeras muestras se volvieron positivas, se analizaron muestras de heces individuales. En la primera vacunación, 10, 16 y 21-23 semanas después de la primera vacunación, se pesaron todos los animales.

Resultados del estudio 1

Durante el estudio, una infección de Lawsonia atravesó la pira como lo demuestran los datos de PCR en heces (véase a continuación). Dado que ninguno de los animales, excepto un animal en el grupo de control tenía síntomas clínicos, el grupo se vio afectado por una infección asintomática resultante de una exposición de campo de la bacteria (tipo silvestre).

Carga bacteriana en las heces

Los resultados medios de PCR se dan en la Tabla 1, el número de animales positivos y la concentración media de ADN de *LI* se dan en la Tabla 2.

Desde la semana 13 en adelante en varios animales de control, se encontró ADN de *LI*. El porcentaje de animales de control con muestras fecales positivas aumentó gradualmente de cero a las 12 semanas después de la primera vacunación a través de un 2-8 % en la semana 13-15 hasta alrededor de un 18 % en la semana 16-18, después de lo cual disminuyó al 0 % después de la semana 20.

Tabla 1 Diseminación de *LI* en las heces (PCRc)

Grupo	Animales positivos		Duración positividad (semanas)	
	número	%	media	intervalo
Controles	31	41,3	1,65	1 - 5
Vacunados	1	1,4	1,00	

En el grupo de prueba (vacuna) solo se encontró una única muestra de heces positiva en PCR en un día de recolección para un solo animal (1 de 72 cerdos positivos, es decir, 1,4 %). En el grupo de control, 31 de 75 animales tenían al menos una muestra de heces positiva en PCR (41,3 %). La diferencia entre los grupos fue estadísticamente significativa (prueba exacta de Fisher: valor p < 0,001).

Tabla 2 Número de animales con muestras positivas para *LI* (y porcentaje) y concentración media de *LI* en las muestras fecales positivas, por grupo de vacunación y semana después de la primera vacunación.

semana después de la 1ª vacunación	muestras positivas		pg de ADN/5 µl de muestra positiva (media ± DE)	
	Controles	Vacuna	Controles	Vacuna
12	0 (0 %)	0 (0 %)		
13	2 (2,7 %)	0 (0 %)	138 ± 83	
14	6 (8,0 %)	0 (0 %)	290 ± 396	
15	2 (2,7 %)	0 (0 %)	314 ± 19	

(continuación)

semana después de la 1ª vacunación	muestras positivas		pg de ADN/5 µl de muestra positiva (media ± DE)	
	Controles	Vacuna	Controles	Vacuna
16	14 (18,7 %)	1 (1,4 %)	1262 ± 2458	119
17	14 (19,7 %)	0 (0 %)	885 ± 833	
18	9 (17,6 %)	0 (0 %)	1627 ± 3680	
19	3 (5,7 %)	0 (0 %)	1387 ± 1278	
20	1 (3,0 %)	0 (0 %)	98	
21	0 (0 %)	0 (0 %)		
22	0 (0 %)	0 (0 %)		
23	0 (0 %)	0 (0 %)		

Aumento de peso corporal

5 El peso corporal y el aumento de peso diario promedio se resumen en las Tablas 3 y 4 a continuación. El ADWG se considera un parámetro relevante que a menudo se usa para medir la eficacia de las vacunas de Lawsonia. Sin embargo, este parámetro no es específico, ya que está influenciado por varias condiciones diferentes (infecciones secundarias, clima, alimentación, etc.). El tamaño de muestra calculado preliminar para obtener valores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) a una diferencia de ADWG de 25 gramos por día necesitaría ser de aproximadamente 300 animales por grupo. Por razones de eficacia, los grupos realmente utilizados se hicieron considerablemente más pequeños. En este estudio piloto, el tamaño de los grupos fue de solo 78 y 80 animales. Entonces, incluso si la diferencia en ADWG fuera de aproximadamente 25 gramos por día, el valor p resultante se estimó por encima de 0,05 en cualquier caso.

15 **Tabla 3** Peso corporal medio (kg, ± DE), por grupo de vacunación y período.

	Control	Vacuna
Ingreso (3-10 días)	1,4 ± 0,3 (n = 76)	1,5 ± 0,3 (n = 80)
En el traslado a la terminación (10 semanas)	27,7 ± 4,8 (n = 74)	28,5 ± 4,1 (n = 73)
Tercer pesaje (± 16 semanas de edad)	64,0 ± 9,2 (n = 73)	65,6 ± 9,1 (n = 71)
Último pesaje (18 a 24 semanas de edad)	89,4 ± 16,8 (n = 72)	92,3 ± 17,0 (n = 71)

20 La comparación del grupo de tratamiento para el aumento de peso diario promedio durante la fase de terminación (véase a continuación) no condujo, como se esperaba, a ninguna diferencia estadísticamente significativa (valor p 0,2042). Si se corrigió para los valores de referencia, el grupo vacunado mostró una media de 21,4 gramos por día de aumento de peso diario en el período de terminación mayor que el grupo de control, con un intervalo de confianza al 90 % que varía de 6,4 gramos por día, más bajo, a 49,2 gramos por día, más alto. Una diferencia media de 21,4 gramos por día en sí misma es una diferencia sustancial en ADWG. Las medias de mínimos cuadrados (LSM, por sus siglas en inglés) para el aumento de peso diario promedio de los dos grupos fueron 881 gramos por día para el grupo vacunado y 860 gramos por día para el grupo control. Estas LSM se ajustan a la comparación de grupos mediante ANCOVA, pero son ligeramente diferentes de las medias ordinarias de la Tabla 3, ya que se corrigen por las pequeñas diferencias en el peso covariable en la vacunación entre los grupos.

Tabla 4 Media del aumento de peso diario promedio en gramos*, por grupo de vacunación y período.

	LSM ± EEM	Intervalo de confianza al 90 %	n cerdos
Periodo de terminación			
Control	859,9 ± 14,5	835,7 - 884,2	72
Vacuna	881,3 ± 14,6	856,8 - 905,9	71
Control - Vacuna	-21,4 ± 16,8	-49,2 - 6,4	

(continuación)

	LSM ± EEM	Intervalo de confianza al 90 %	n cerdos
Global			
Control	621,6 ± 10,1	604,6 - 638,5	72
Vacuna	634,0 ± 10,2	616,9 - 651,2	71
Control - Vacuna	-12,4 ± 11,5	-31,5 - 6,6	
*: Media del ADWG ajustada por camada, lote y peso al ingreso ± error estándar de la media (EEM) e intervalo de confianza al 90 %.			

El valor p para el efecto del tratamiento sobre el aumento de peso diario promedio global fue de 0,2804. Si se corrigió para los valores de referencia, el grupo vacunado mostró un aumento de peso diario promedio que fue 12,5 g/día mayor que el grupo de control. El intervalo de confianza al 90 % para esta estimación varió desde un crecimiento que fue 6,6 g/día más bajo hasta un crecimiento que fue 31,5 g/día más alto en el grupo vacunado que en el grupo de control.

ESTUDIO 2

Diseño del estudio 2

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de la misma vacuna que se utilizó en el primer estudio en cerdos de terminación en condiciones de campo, pero como una vacuna de dosis única. El estudio se realizó como un ensayo de eficacia clínica aleatorizado, enmascarado, controlado con solución salina. Aproximadamente 750 lechones de 3-4 semanas de edad se asignaron aleatoriamente dentro de la camada al grupo de prueba o al de control. Los lechones del grupo de prueba se vacunaron una vez por vía intramuscular con 2 ml de la vacuna y los lechones del grupo de control se inyectaron con 2 ml de solución salina. A una edad de 10 (± 1) semanas, 648 lechones de estudio, 324 de cada grupo de tratamiento, se transportaron a la granja de terminación. A partir de entonces, los cerdos de control se alojaron en corrales separados de los cerdos vacunados en la misma unidad (8 corrales de 8-11 animales por grupo de tratamiento por unidad) hasta el sacrificio (a una edad de 25 semanas)

Un primer parámetro evaluado fue el aumento de peso diario promedio (ADWG) de los cerdos entre las diferentes pesadas: al ingreso, después de la transferencia a la granja de terminación y justo antes del sacrificio. Un segundo parámetro evaluado fue la diseminación de Lawsonia: después de la transferencia a la granja de terminación, a las 15 y 20 semanas de edad y justo antes del sacrificio.

Resultados del estudio 2

Durante este segundo estudio, una infección de Lawsonia atravesó la piara como lo demuestran los datos de PCR en las heces. Solo un animal en el grupo control tuvo síntomas clínicos leves (confirmado como el resultado de una infección por Lawsonia, según lo determinado después de la necropsia). Por lo tanto, se puede confirmar que el grupo se vio afectado por una infección asintomática como resultado de una exposición de campo a la bacteria (tipo silvestre).

El efecto sobre ADWG se indica en la Tabla 5. Como se puede observar, el aumento de peso diario promedio durante el período de cría fue de 319 gramos por día en el grupo de prueba y 307 gramos por día en el grupo de control. Las diferencias en el aumento de peso diario promedio (ADWG) durante el período de cría fueron significativamente diferentes entre el grupo de control y el de prueba (ANOVA: p = 0,0203). El ADWG en el período de terminación, y el ADWG global también fueron mayores en el grupo de prueba. Aunque las diferencias de 7 gramos por día entre el grupo de control y el de prueba son comercialmente relevantes (lo que lleva a una diferencia en el peso final de aproximadamente 1,4 kg), no fueron estadísticamente significativas.

Tabla 5. Aumento de peso diario promedio (g/día), por grupo de vacunación y período

	Grupo de control	Grupo de prueba
Cría	307 ^a	319 ^b
Terminación	764 ^c	771 ^d
Global	633 ^e	640 ^f
^{ab} Modelo mixto ANCOVA, p = 0,0203 ^{cd} Modelo mixto ANCOVA, p = 0,6356 ^{ef} Modelo mixto ANCOVA, p = 0,4229		

Con respecto a la diseminación de *Lawsonia*, parecía que en la semana 6 de estudio todas las muestras fecales eran negativas para *Lawsonia intracellularis*. En la semana 11, siete muestras (19 %) del grupo de control y ninguna del grupo de prueba fueron positivas. En la semana 16, siete muestras (19 %) del grupo de control y una del grupo de prueba fueron positivas. En la semana 21 todos los animales fueron negativos nuevamente. El número de corrales con muestras fecales positivas en PCR para *Lawsonia* (durante 1 o 2 semanas consecutivas) durante el estudio fue significativamente menor en el grupo de prueba (prueba exacta de Fisher, $p < 0,001$) en comparación con el grupo de control.

10 ESTUDIO 3

Diseño del estudio 3

El objetivo principal de este estudio fue evaluar aún más la eficacia de la vacuna utilizada en los estudios previos en condiciones de campo contra la diseminación bacteriana, después de un esquema de vacunación de una o dos dosis. El estudio se llevó a cabo de acuerdo con un diseño aleatorizado y enmascarado en una granja familiar que tenía una infección de *Lawsonia* en su piara. Los lechones lactantes sanos de 3-10 días de edad se asignaron aleatoriamente, dentro de las camadas, a uno de los dos grupos de prueba o un grupo de control (320 animales por grupo). Los lechones en un grupo de prueba (2 x 1 ml) se vacunaron con 1 ml de la vacuna a los 3-10 días de edad y 21 días después se repitió esta vacuna. Los lechones del otro grupo de prueba (1 x 2 ml) se vacunaron con 2 ml de la vacuna a los 24-31 días de edad. Los lechones en el grupo control se inyectaron con 1 ml de solución salina a los 3-10 días de edad y 21 días después. Se tomaron muestras fecales para *Lawsonia* para PCR en las semanas 6, 8, 10, 12 y semanalmente a partir de entonces hasta que los cerdos se sacrificaron a la edad de 23 semanas.

25 *Resultados del estudio 3*

Durante este segundo estudio, una infección de *Lawsonia* atravesó la piara como lo demuestran los datos de PCR en las heces. Ningún animal tenía síntomas clínicos de una infección por *Lawsonia*. Por lo tanto, el grupo se vio afectado por una infección asintomática resultante de una exposición de campo de la bacteria (tipo silvestre).

Con respecto a la diseminación de *Lawsonia*, se encontró una gran diferencia en la aparición de muestras de heces positivas entre los lotes de parición del grupo de control: en el primer lote de parición, las muestras de control positivo se encontraron tarde durante la terminación (semana 18 y 19), en el segundo lote solo se encontraron muestras positivas en la semana 21 y en el tercer lote se encontró una muestra positiva en la semana 21. Sin embargo, en el cuarto lote desde la semana 17 en adelante se detectaron muestras positivas, mientras que en el quinto lote ya en la semana 14 se encontró una muestra positiva. En resumen, el 50 % de los controles administraron una o más muestras positivas a partir de la semana 14 en adelante, dos (6 %) del grupo de 2 x 1 ml y 4 (12 %) del grupo de 1 x 2 ml fueron positivas. El número de animales con muestras fecales positivas de PCR para *Lawsonia* (durante 1 o 2 semanas consecutivas) durante el estudio fue significativamente menor en el grupo de 1 x 2 ml (prueba exacta de Fisher, $p < 0,0001$) y en el grupo de 2 x 1 ml (prueba exacta de Fisher, $p = 0,0002$) en comparación con el grupo de control.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una vacuna que comprende antígeno de *Lawsonia intracellularis* no vivo y un vehículo farmacéuticamente aceptable para usar en un método para reducir en un cerdo la diseminación de bacterias *Lawsonia intracellularis* asociada a una infección asintomática posterior a la vacunación con *Lawsonia intracellularis*, mediante la administración sistémica de la vacuna al cerdo.
- 10 2. La vacuna para usar de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizada por que** el método es para evitar la diseminación de las bacterias.
3. La vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** el método además es para reducir el impacto negativo en el aumento de peso diario promedio (ADWG) del cerdo asociado a la infección asintomática con *Lawsonia intracellularis*.
- 15 4. La vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la vacuna se administra solo una vez.
- 20 5. La vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** la vacuna se administra cuando el cerdo tiene 3-10 días de edad.
6. La vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** el antígeno de *Lawsonia intracellularis* no vivo comprende los hidratos de carbono que en bacterias *Lawsonia intracellularis* vivas están asociados a la membrana celular externa de estas bacterias.
- 25 7. La vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** el antígeno de *Lawsonia intracellularis* no vivo es antígeno purificado a partir de una composición que comprende bacterias *Lawsonia intracellularis* inactivadas.
- 30 8. La vacuna para usar de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizada por que** el antígeno de *Lawsonia intracellularis* no vivo es *Lawsonia intracellularis* de célula completa inactivada.