



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0819149-2 B1



(22) Data do Depósito: 29/10/2008

(45) Data de Concessão: 23/11/2021

(54) Título: VACINA DE MYCOPLASMA BOVIS

(51) Int.Cl.: A61K 39/02.

(30) Prioridade Unionista: 25/06/2008 US 61/075,552; 29/10/2007 US 60/983,482.

(73) Titular(es): BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA INC..

(72) Inventor(es): MICHAEL BECK; JEFFREY KNITTEL.

(86) Pedido PCT: PCT US2008081545 de 29/10/2008

(87) Publicação PCT: WO 2009/058833 de 07/05/2009

(85) Data do Início da Fase Nacional: 28/04/2010

(57) Resumo: CEPA DE BACTÉRIA M. BOVIS, MÉTODO DE ATENUAÇÃO DE M. BOVIS, COMPOSIÇÃO IMUNOGÊNICA, MÉTODO DE PRODUÇÃO DA MESMA E BACTÉRIA M. BOVIS. A presente invenção refere-se a novas cepas bacterianas de M. bovis atenuadas. Além disso, a presente invenção também fornece composições imunogênicas compreendendo bactérias vivas de uma daquelas cepas bacterianas de M. bovis atenuadas, sua produção e uso para o tratamento e a profilaxia de infecções por M. bovis.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**VACINA DE MYCOPLASMA BOVIS**".

Pedidos de Patente Relacionados

[0001] Este pedido de patente reivindica o benefício de prioridade do Pedido Provisório de Patente U.S. número de série 60/983.482, depositado em 29 de outubro de 2007, e Pedido Provisório de Patente U.S. número de série 61/075.552, depositado em 25 de junho de 2008, os ensinamentos e conteúdo dos quais são por meio deste incorporados por referência.

Listagem De Sequência

[0002] Este pedido de patente contém uma listagem de sequência em formato de papel e em formato legível em computador, os ensinamentos e conteúdo da qual são por meio deste incorporados por referência.

Antecedente

[0003] *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*) é considerado uma das espécies mais patogênicas de Micoplasma e causa perdas econômicas significantes no mundo inteiro. Micoplasmas causam sinais clínicos severos em gado de todas as idades. *M. bovis* é o patógeno Micoplasma mais frequente encontrado causando pneumonia, mastite e artrite no gado e seu papel etiológico também está associado com otite, queratoconjuntivite, sinovite e distúrbios reprodutivos em vacas e touros. Em geral, Micoplasmas são difíceis de tratar, uma vez que não têm uma parede celular ou membrana, que tende a torná-los resistentes a várias classes de tratamentos de antibiótico de largo espectro comumente usados. Micoplasmas diferenciam-se de vírus em que Micoplasmas são maiores do que a maior parte de vírus e danifica células de tecido ligando-se à superfície das células e destruindo-as, ao invés de se introduzir nas células. Animais infectados com *M. bovis* têm respostas imunes deprimidas e podem exibir sinais da infecção por *M. bovis*, tais

como febre, depressão, anorexia, respiração difícil, descarga nasal e ocular, tosse, espirro, respiração pesada, ronco, coxeadura e articulações inchadas, mastite, infecções de ouvido médio, abortos, prostração e morte. O organismo persiste em ambientes insalubres, quentes, úmidos. Micoplasmas pode sobreviver no leite, e até parecer vicejar na presença de grandes números de leucócitos, que são produzidos em resposta à infecção.

[0004] Há várias referências disponíveis na técnica descrevendo vacinas para *M. bovis*. A patente N° 6.548.069 descreve uma composição de vacina que se incorpora em uma bacterina inativada de célula inteira contendo pelo menos duas cepas de *M. bovis* morto. Outras referências disponíveis descrevem passagem de uma cepa de *M. bovis* menos de 10 vezes para preparar uma vacina inativada, mas não descrevem a atenuação de uma cepa de *M. bovis* infecciosa ou patogênica através de passagem em série ou qualquer dessa cepa de *M. bovis* viva atenuada como essência da vacina de cultura viva avirulenta. A técnica prévia é deficiente em que *M. bovis* morto não é tão eficaz ou eficiente na diminuição da severidade de sintomas clínicos associados com uma infecção por *Mycoplasma bovis*. Mesmo a passagem a um nível baixo não produz uma vacina de Micoplasma com alta eficácia tal que os sintomas clínicos sejam muito reduzidos. A baixa passagem, inativada, de vacinas de *M. bovis* que estão disponíveis não mostram uma grande redução da severidade de sintomas clínicos. Adicionalmente, a patente '069 fortemente ensina longe da ideia de uma alta passagem, cepa atenuada de *M. bovis* que é usada em uma composição imunogênica ou composição de vacina pelo ensinamento:

"Como um Micoplasma isolado pode alterar rapidamente seus antígenos em cultura, cepas de alta passagem maior do que aproximadamente 50 passagens podem perder a infectividade e provocar uma resposta imune pior quando

usada em uma bacterina da presente invenção. Por isso, é preferível empregar cepas recentemente isoladas ou cepas cultivadas que são ainda virulentas; isto é, as cepas que conseraram a capacidade de ser infecciosas no animal hospedeiro. Enquanto se sabe nenhum número crítico de gerações existe, a presente invenção preferencialmente começa com uma cepa de *Micoplasma* que foi passada não mais do que aproximadamente dez, e preferencialmente somente aproximadamente cinco ou menos vezes antes da escala de produção em massa. Usando cepas com menos gerações em cultura, acredita-se que os antígenos conservam seu estado natural e dessa forma provocarão uma resposta imune protetora contra o micro-organismo infeccioso".

[0005] Consequentemente, o que é necessário na técnica é uma composição imunogênica eficaz para obtenção de uma resposta imunológica contra *M. bovis*. O que é necessário ainda é uma composição imunogênica eficaz para diminuir a severidade ou reduzir a incidência de sinais da infecção por *M. bovis*. O que é necessário ainda é uma vacina eficaz para reduzir ou eliminar a incidência de sinais da infecção por *M. bovis*. O que é necessário ainda é uma composição imunológica eficaz para diminuir a severidade ou reduzir a incidência de sinais da infecção por *M. bovis* que possa ser seguramente administrada a um animal em necessidade da mesma. O que é necessário ainda é uma composição imunológica como descrito acima que induza a proteção cruzada e provoque uma resposta imune contra cepa de *M. bovis* diferente e isolada do que aquelas cepas ou isoladas usadas na composição. O que ainda é necessário é uma composição imunológica segura e eficaz que é adequada como um regime de imunização de uma dose ou duas doses ou multidoses (dose inicial

seguida por reforço(s) auxiliar(es)), uma composição imunológica adequada e conveniente para administração por várias vias, e uma composição imunológica que seja compatível com outros imunógenos e composições imunológicas para preparação de vacinas de combinação. Finalmente, o que é necessário é uma composição imunológica como descrito acima que fornece o início rápido de proteção e proteção de longa duração a um animal em necessidade da mesma.

Sumário da Invenção

[0006] A composição imunogênica ou de vacina da presente invenção superam os problemas presentes na técnica prévia pelo fornecimento de cepas avirulentas e atenuadas de *M. bovis*, preferencialmente de alta passagem, capazes de serem combinadas com um veículo farmacêutica ou veterinariamente aceitável, que podem ser usadas como uma composição imunogênica com a eficácia melhorada tal que sinais de infecção por *M. bovis* e/ou a própria infecção por *M. bovis* e/ou incidência ou severidade, fossem reduzidos em comparação com a infecção por cepas de *M. bovis* de tipo selvagem, preferencialmente bem em comparação com vacinas atualmente disponíveis. Em outras palavras, os bezerros vacinados conforme a presente invenção estão em um risco menor de desenvolver sinais de infecção por *M. bovis*, e quaisquer sinais clínicos que resultem seriam menos severos ou prevalentes do que em animais que não recebem qualquer vacina, mas foram infectados por *M. bovis* ou não receberam uma vacina conforme a presente invenção. Adicionalmente, os rebanhos experimentariam um menor número de animais infectados em um rebanho quando os animais são administrados com a vacina conforme a presente invenção quando comparados com animais não-vacinados, mas infectados, preferencialmente quando comparados com animais vacinados com a vacina disponível convencional. Vantajosamente, a vacina da presente invenção é uma formulação de

vacina estável com alta eficácia que fornece tanto início rápido como proteção de longa duração. Devido aos ensinamentos da técnica prévia, a composição da presente invenção forneceu resultados surpreendentes naquelas cepas de *M. bovis*, preferencialmente cepas de alta passagem de *M. bovis* foram atenuadas, vivas, e mais altamente eficazes como os componentes da composição imunogênica.

[0007] A invenção descrita neste pedido fornece cepas avirulentas e atenuadas ou isoladas de *M. bovis*, preferencialmente de cepas atenuadas de alta passagem de *M. bovis* que obtêm ou provocam uma resposta imune quando administradas a um animal. Vantajosamente, a resposta imune protege os animais que recebem a administração da composição da presente invenção tal que animais individuais estejam em um risco menor de desenvolver sinais de infecção por *M. bovis*, e tais sinais seriam menos severos ou prevalentes do que em animais que não recebem a composição ou em animais que recebem uma vacina ou composição não feita conforme a presente invenção.

[0008] As requerentes observam que para os objetivos da presente invenção, os termos "isolado" e "cepa" são usados intercambiavelmente e que as diferenças entre cepas individuais ou isoladas podem ser detectadas usando impressão digital de DNA (isto é, cepas diferentes ou isoladas terão impressões digitais que se diferenciam).

[0009] Em uma modalidade, uma composição imunogênica é descrita, a qual compreende uma cepa de alta passagem de *M. bovis* e um veículo farmacêuticamente aceitável. Preferencialmente, a dita cepa de *M. bovis* é atenuada e avirulenta. A composição imunogênica da presente invenção produz uma resposta imunogênica contra a infecção por *M. bovis* em gado. A resposta imunogênica à infecção por *M. bovis* gerada ou induzida pela administração da composição imunogênica reduz muito a severidade ou incidência de sinais da infecção por *M. bovis*. Em outra modalidade, um método de produção de uma

composição imunogênica incluindo uma cepa de alta passagem de *M. bovis*, preferencialmente uma cepa de *M. bovis* atenuada, avirulenta, de alta passagem é descrita. Em outra modalidade, um método de estimulação de uma resposta imune humoral sorológica duradoura rápida e longa, e consequentemente, proteção de doença, usando a composição imunogênica em bezerros é descrita. Ainda em outra modalidade, um método de imunização de bezerros contra infecção por *M. bovis* pela administração da composição imunogênica da presente invenção em uma quantidade eficaz é descrito. A composição imunogênica ou de vacina da presente invenção, quando administrada a bezerros posteriormente desafiados com uma cepa de tipo selvagem de *M. bovis*, exibiram uma redução em sinais da infecção por *M. bovis* incluindo uma redução em sintomas clínicos, patologia de pulmão, coxeadura e patologia articular normalmente associadas à infecção por *M. bovis*. Especificamente, uma redução na patologia de pulmão e uma redução apreciável de sintomas clínicos articulares e coxeadura associada foram observadas no grupo vacinado. Em outra modalidade da presente invenção, um método para reduzir sinais da infecção por *M. bovis* é descrito, preferencialmente pela administração de alguma das bactérias de *M. bovis* atenuadas, avirulentas de acordo com a invenção e/ou descrito nos presentes pedidos de patente. A redução de sinais da infecção por *M. bovis* é alcançada pela administração da composição imunogênica da presente invenção.

[00010] Em uma modalidade preferencial da presente invenção, os bezerros foram administrados com uma de três vacinas vivas ou composições imunogênicas, cada uma compreendendo uma cepa de *M. bovis* de alta passagem, atenuada e um veículo farmacêuticamente aceitável. As cepas de *M. bovis* de alta passagem são preferencialmente passadas mais de 10, preferencialmente pelo menos 20, ainda mais preferencialmente pelo menos 30, ainda mais

preferencialmente pelo menos 40, ainda mais preferencialmente, pelo menos 50, ainda mais preferencialmente pelo menos 55, ainda mais preferencialmente pelo menos 60, mesmo mais preferencialmente pelo menos 70, ainda mais preferencialmente, pelo menos 80, ainda mais preferencialmente pelo menos 90, ainda mais preferencialmente pelo menos 95, ainda mais preferencialmente pelo menos 100, ainda mais preferencialmente pelo menos 102 vezes, e ainda mais preferencialmente pelo menos 106 vezes, preferencialmente na cultura celular *in vitro*. As cepas de *M. bovis* úteis na composição imunogênica ou de vacina podem ser qualquer cepa ou isolado. Três cepas representativas incluem 052823A106, depositado na ATCC em Manassas, VA em 16 de outubro de 2007 sob os termos do Tratado de Budapeste e indicada como PTA-8694; 05249A102, também depositada na ATCC em Manassas, VA em 16 de outubro de 2007 nas condições do Tratado de Budapeste e indicada como PTA 8696; e 0519021B 106, também depositado na ATCC em Manassas, VA em 16 de outubro de 2007 e indicada como PTA 8695. Cada uma destas cepas antes de passagem é patogênica, mas após passagem de cada uma destas cepas como descrito acima, e particularmente depois de passagem mais de 100 vezes, cepas resultantes de passagem foram atenuadas, avirulentas, e produziram uma resposta imune em um animal que recebe uma administração da composição imunogênica da cepa. Os bezerros foram posteriormente desafiados com *M. bovis* isolado obtido de erupções da doença que ocorre naturalmente. Em todos os exemplos neste pedido, o desafio isolado tinha uma "impressão digital" diferente (como determinado abaixo) do que isolados usados para vacinação (isto é, foi um desafio heterólogo). Vantajosamente, a administração das cepas passadas resultou em respostas imunes que reduziram a severidade e/ou incidência de sintomas clínicos da infecção por *M. bovis* após desafio com uma cepa

patogênica ou cepa de tipo selvagem de *M. bovis*.

[00011] Dessa forma, de acordo com um aspecto adicional, a presente invenção relaciona-se a qualquer uma das cepas de bactérias *M. bovis* atenuadas depositadas na ATCC sob números de acesso PTA-8694; PTA 8695; ou PTA 8696, preferencialmente bem como a qualquer descendente de cepas de bactérias atenuadas de *M. bovis* de alguma das cepas de bactérias *M. bovis* depositadas precedentes que podem ser usadas em uma composição imunogênica com eficácia melhorada tal que sinais de infecção por *M. bovis* e/ou a própria infecção por *M. bovis* e/ou incidência ou severidade, foram reduzidos em comparação com a infecção por cepa de *M. bovis* de tipo selvagem, preferencialmente bem como em comparação com vacinas atualmente disponíveis, e com alta eficácia que fornece tanto início rápido como proteção de longa duração.

[00012] De acordo com outro aspecto, a presente invenção também fornece composições imunogênicas como descrito neste pedido, compreendendo alguma das cepas de bactérias *M. bovis* atenuadas depositadas na ATCC sob números de acesso PTA-8694; PTA 8695; ou PTA 8696 ou qualquer descendente atenuado de cepa bacteriana de *M. bovis* de qualquer uma das cepas de bactérias *M. bovis* precedentes depositadas. Preferencialmente, aquelas composições imunogênicas compreendendo qualquer uma das cepas de bactérias *M. bovis* atenuadas depositadas na ATCC sob números de acesso PTA-8694; PTA 8695; ou PTA 8696. Qualquer uma das cepas de bactérias *M. bovis* precedentes específicas pode ser usada. Além disso, a presente invenção também se relaciona ao uso veterinário de qualquer uma daquelas cepas de *M. bovis* atenuadas específicas como descrito neste pedido, por exemplo, para a redução da severidade e/ou incidência de sintomas clínicos da infecção por *M. bovis* após desafio com uma cepa patogênica ou cepa de tipo selvagem de *M. bovis*.

[00013] De acordo com outro aspecto, a presente invenção também se relaciona a bactérias de *M. bovis* atenuadas que têm as mesmas características que as cepas de bactérias *M. bovis* depositadas na ATCC sob números de acesso PTA-8694; PTA 8695 ou PTA 8696. O termo "tendo as características como as cepas de bactérias *M. bovis* depositadas na ATCC sob números de acesso PTA-8694; PTA 8695; ou PTA 8696" significa que tal cepa de bactérias é atenuada, capaz de induzir uma resposta imune humoral em um bezerro em 14 dias após administração de uma dose de $2,1 \times 10^9$ CFU através da via subcutânea ou intranasal a um bezerro, e não causar sinais clínicos normalmente causados por uma infecção com uma cepa patogênica de *M. bovis* de tipo selvagem. Como um método de referência, a resposta imune humoral deve ser determinada pelo conjunto ELISA de *M. bovis* BIOVET usando o protocolo fornecido no conjunto de teste. Preferencialmente, cada uma daquelas cepas induz uma resposta imune humoral em 14 dias após administração de uma dose de 2×10^9 CFU através da via subcutânea ou intranasal a um bezerro, que tem um escore de ELISA relativo no conjunto ELISA de *M. bovis* BIOVET usando o protocolo fornecido no conjunto de teste de pelo menos 1,5 quando expresso como leituras de Densidade Ótica (O.D.).

[00014] A composição da presente invenção pode ser administrada de qualquer maneira convencional. Exemplos de métodos de administração incluem qualquer um que permita o acesso pelas células do sistema imune à composição imunogênica: oral, transdérmica/intradérmica, intravenosa, subcutânea, intramuscular, intraocular, intraperitoneal, intrarretal, intravaginal, intranasal, intragástrica, intratraqueal, intrapulmonar ou qualquer combinação das mesmas. Modos preferenciais de administração são intramusculares, subcutâneos e intranasais, com subcutâneo e intranasal sendo especialmente preferenciais. Se desejado ou necessário, imunizações

de reforço podem ser dadas uma vez ou várias vezes em vários intervalos. Após administração de tal vacina, uma resposta imune é provocada no animal e os sinais de infecção por *M. bovis* são reduzidos em incidência e/ou severidade quando exposto a bactérias ou isolados de tipo selvagem após desafio com uma forma virulenta de *M. bovis*. Além disso, a composição imunogênica ou de vacina da presente invenção exibiu proteção cruzada eficaz contra cepas além da cepa de *M. bovis* passada para atenuação e então usada como um componente antigênico.

[00015] Em formas preferenciais, o volume de dose da vacina é não mais do que 5 ml, mais preferencialmente não mais do que 3 ml, e mais preferencialmente não mais do que 2 ml. Em uma modalidade mais preferencial, a dose seria 2 ml, preferencialmente administrada intranasalmente, com 1 ml sendo administrado em cada narina, ainda mais preferencialmente administrada subcutaneamente, e ainda mais preferencialmente administrada tanto intranasalmente como subcutaneamente em uma ocasião como uma dose única. Em algumas formas preferenciais, uma segunda ou subsequente administração da composição imunogênica seria administrada após a primeira administração. Tal administração subsequente ocorreria preferencialmente pelo menos 10 dias após administração inicial, mais preferencialmente entre pelo menos 10 a 32 dias, mais preferencialmente entre pelo menos 12 a 30 dias, ainda mais preferencialmente pelo menos 14 dias, e ainda mais preferencialmente entre pelo menos 14 a 28 dias. Nas formas mais preferenciais, a vacina seria administrada no Dia 0 como uma dose única ou, em formas alternativas, no Dia 0 e 14 a 28 dias após isso com exposição a formas patogênicas de *M. bovis* não ocorrendo até o fim da realização do regime de imunização. Em uma forma mais preferencial, nenhum reforço é necessário e a vacina é administrada somente uma vez. A

vacina é administrada a animais a partir de 1 dia de idade até idade adulta, preferencialmente a bezerros de 1 dia de idade até gado adulto jovem de 2 anos da idade, mais preferencialmente a bezerros de 1 dia de idade até 16 semanas de idade, e ainda mais preferencialmente a bezerros de 6 semanas a 12 semanas de idade. Tal administração reduziu sinais de infecção por *M. bovis* como descrito abaixo. De fato, os estudos neste pedido mostram que os sinais da infecção por *M. bovis* no grupo vacinado como descrito acima foram reduzidos em pelo menos 50%, mais preferencialmente pelo menos 60%, ainda mais preferencialmente pelo menos 70%, e ainda mais preferencialmente pelo menos 75% em comparação com o grupo não-vacinado. Estimativa de patologia de pulmão, especificamente a porcentagem da consolidação de pulmão atribuída a lesões devido a *M. bovis* como habitualmente marcado para várias espécies foi feita pós-necrópsia e foi reduzida quando comparada com o grupo não vacinado, em pelo menos 33%, mais preferencialmente pelo menos 50%, ainda mais preferencialmente pelo menos 70%, ainda mais preferencialmente pelo menos 80%, ainda mais preferencialmente pelo menos 90%, e ainda mais preferencialmente em pelo menos 95%.

[00016] Em outra modalidade preferencial, a vacina da presente invenção é combinada com um adjuvante adequado. "Adjuvantes" como usados neste pedido, podem incluir hidróxido de alumínio e fosfato de alumínio, saponinas, por exemplo, Quil A, QS-21 (Cambridge Biotech Inc., Cambridge MA), GPI-0100 (Galenica Pharmaceuticals, Inc., Birmingham, AL), emulsão água-em-óleo, emulsão óleo-em-água, emulsão água-em-óleo-em-água. A emulsão pode ser baseada particularmente no óleo de parafina líquida leve (tipo da Farmacopeia Europeia); óleo isoprenoide, tal como esqualano ou esqualeno; óleo resultante da oligomerização de alquenos, em particular, de isobuteno ou deceno; ésteres de ácidos ou de álcoois contendo um grupo alquila

linear, mais particularmente óleos vegetais, oleato de etila, di-(caprilato/caprato) de propilenoglicol, tri-(caprilato/caprato) de glicerila ou dioleato de propilenoglicol; ésteres de ácidos graxos ou álcoois ramificados, em particular, ésteres de ácido isoesteárico. O óleo é usado em combinação com emulsificadores para formar a emulsão. Os emulsificadores são tensoativos preferencialmente não-iônicos, em particular, ésteres de sorbitano, de mannide (por exemplo, oleato de anidromanitol), de glicol, de poliglicerol, de propilenoglicol e dos ácidos oleico, isoesteárico, ricinoleico ou hidroxiesteárico, que são opcionalmente etoxilados, e blocos de copolímero polioxipropileno-polioxietileno, em particular, os produtos Pluronic, especialmente L121. Ver Hunter et al., *The Theory and Practical Application of Adjuvants* (Ed. Stewart-Tull, D. E. S.). John Wiley e Sons, NY, pp 51-94 (1995) e Todd et al., *Vaccine* 15:564-570 (1997).

[00017] Por exemplo, é possível usar a emulsão SPT descrita na página 147 de "Vaccine Design, The Subunit and Adjuvant Approach" editada por M. Powell e M. Newman, Plenum Press, 1995, e a emulsão MF59 descrita na página 183 deste mesmo livro.

[00018] Um exemplo adicional de um adjuvante é um composto escolhido a partir dos polímeros de ácido acrílico ou metacrílico e os copolímeros de anidrido maleico e derivado de alquenila. Compostos adjuvantes vantajosos são os polímeros de ácido acrílico ou metacrílico que são reticulados, especialmente com éteres de polialquenila de açúcares ou poliálcoois. Estes compostos são conhecidos pelo termo carbômero (Phameuropa Vol. 8, No. 2, Junho de 1996). Versados na técnica também podem referir-se à Patente U.S. No. 2.909.462 que descreve tais polímeros acrílicos reticulados com um composto poli-hidroxilado que tem pelo menos 3 grupos hidroxilas, preferencialmente não mais de 8, os átomos de hidrogênio de pelo menos três hidroxilas sendo substituídos por radicais alifáticos insaturados que têm pelo

menos 2 átomos de carbono. Os radicais preferenciais são aqueles contendo de 2 a 4 átomos de carbono, por exemplo, vinilas, alilas e outros grupos etilenicamente insaturados. Os radicais insaturados podem conter outros substituintes, tais como metila. Os produtos vendidos sob o nome Carbopol; (BF Goodrich, Ohio, USA) são particularmente apropriados. Eles são reticulados com uma alil sacarose ou com alil pentaeritritol. Entre eles, pode ser mencionado Carbopol 974P, 934P e 971P. Ainda mais preferencial é o uso de Carbopol 971P. Entre os copolímeros de anidrido maleico e derivado de alquenila, são os copolímeros EMA (Monsanto) que são copolímeros de anidrido maleico e etileno. A dissolução destes polímeros em água leva a uma solução ácida que será neutralizada, preferencialmente ao pH fisiológico, a fim de fornecer a solução adjuvante na qual a própria composição imunogênica, imunológica ou de vacina será incorporada.

[00019] Adjuvantes adicionais adequados incluem, mas não são limitados ao sistema adjuvante RIBI (Ribi Inc.), bloco de copolímero (CytRx, Atlanta GA), SAF-m (Chiron, Emeryville CA), monofosforil lipídio A, adjuvante lipídio-amina de Avridine, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante ou de outra maneira), toxina de cólera, IMS 1314 ou muramil dipeptídico ou citocinas de ocorrência natural ou recombinantes ou análogos dos mesmos ou estimulantes de liberação de citocina endógena, entre muitos outros. Preferencialmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1 g por dose. Ainda mais preferencialmente, o adjuvante é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 100 µg a aproximadamente 500 mg por dose. Ainda mais preferencialmente o adjuvante é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 500 µg a aproximadamente 250 mg por dose. Ainda mais preferencialmente o adjuvante é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 750 µg a aproximadamente 100 mg por dose. Ainda mais preferencialmente

o adjuvante é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 50 mg por dose. Ainda mais preferencialmente o adjuvante é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 10 mg por dose. Ainda mais preferencialmente o adjuvante é adicionado em uma quantidade de aproximadamente 1 mg por dose.

[00020] Além disso, as composições imunogênicas e de vacina da presente invenção podem incluir um ou mais veículos veterinários aceitáveis. Como usado neste pedido, "um veículo veterinário aceitável" inclui qualquer e todos os solventes, meios de dispersão, revestimentos, adjuvantes, agentes de estabilização, diluentes, conservantes, agentes antibacterianos e antifúngicos, agentes isotônicos, agentes de retardo de adsorção e similares. Em algumas modalidades preferenciais, e especialmente aquelas que incluem composições imunogênicas liofilizadas, agentes de estabilização para uso na presente invenção incluem estabilizadores para liofilização ou secagem por congelamento.

[00021] "Diluentes" podem incluir água, solução salina, dextrose, etanol, glicerol e similares. Agentes isotônicos podem incluir cloreto de sódio, dextrose, manitol, sorbitol e lactose, entre outros. Estabilizadores incluem albumina e sais alcalinos de ácido etilenodiaminotetra-acético, entre outros. Uma "composição imunogênica ou imunológica" refere-se a uma composição de matéria que compreende pelo menos um antígeno, que provoca uma resposta imunológica no hospedeiro de uma resposta imune celular e/ou mediada por anticorpo à composição ou vacina de interesse. Normalmente, uma "resposta imunológica" inclui, mas não é limitada a um ou mais dos seguintes efeitos: a produção ou ativação de anticorpos, células B, células T auxiliares, células T supressoras, e/ou células T citotóxicas e/ou células T gama-delta, dirigidas especificamente a um antígeno ou antígenos incluídos na composição ou vacina de interesse. Preferencialmente, o hospedeiro

exibirá uma resposta imunológica terapêutica ou protetora tal que a resistência à nova infecção seja aumentada e/ou a severidade clínica da doença reduzida. Tal proteção será demonstrada por uma redução ou falta de sinais clínicos normalmente exibidos por um hospedeiro infectado, um tempo de recuperação mais rápido e/ou uma duração ou título bacteriano reduzidos nos tecidos ou fluidos corporais ou excreções do hospedeiro infectado.

[00022] "Sinais de infecção por *M. bovis*" referem-se às manifestações de infecção ou doença causada por *M. bovis* tanto incluindo o(s) sintoma(s) clínico(s) como incluindo patologia tipicamente experimentada pelo gado infectado com *M. bovis* de tipo selvagem. Estas manifestações de infecção ou doença podem tomar muitas formas incluindo, mas não limitadas a febre, depressão, anorexia, respiração difícil, descarga nasal e ocular, tosse, espirro, respiração pesada, ronco, coxeadura e articulações inchadas, infecções de ouvido médio, descarga da inflamação do ouvido interno, abortos e outras distúrbios reprodutivas, prostração, infecção respiratória, cabeça caída, ataxia, artrite, mastite, otite, queratoconjuntivite, sinovite, pleurite, lesões de pulmão, consolidação de pulmão e formação nodular nos pulmões, fluido sinovial aumentado, cápsulas articulares espessadas, e até morte.

[00023] "Cepa de Alta Passagem" para os fins desta descrição refere-se a uma cepa de *M. bovis* que foi passada mais de 10, preferencialmente pelo menos 20, ainda mais preferencialmente pelo menos 30, ainda mais preferencialmente pelo menos 40, ainda mais preferencialmente, pelo menos 50, ainda mais preferencialmente pelo menos 55, ainda mais preferencialmente pelo menos 60, ainda mais preferencialmente pelo menos 70, ainda mais preferencialmente, pelo menos 80, ainda mais preferencialmente pelo menos 90, ainda mais preferencialmente pelo menos 95, ainda mais preferencialmente pelo

menos 100, ainda mais preferencialmente pelo menos 102 vezes, e ainda mais preferencialmente pelo menos 106 vezes em cultura celular *in vitro*.

[00024] "Avaliação de Patologia Pulmonar" refere-se à observação dos pulmões após necrópsia, incluindo, mas não limitada à avaliação de consolidação, lesões, e formações nodulares bem como avaliação da cavidade torácica incluindo pleurite e acúmulo de fluido.

[00025] "Atenuação" significa reduzir a virulência de um patógeno. Na presente invenção "atenuação" é sinônimo de "avirulento". Na presente invenção, uma bactéria atenuada é aquela na qual a virulência foi reduzida para que não cause sinais clínicos de uma infecção por *M. bovis*, mas seja capaz de induzir uma resposta imune no mamífero-alvo, mas também pode significar que os sinais clínicos são reduzidos em incidência ou severidade em animais infectados com *M. bovis* atenuado em comparação com um "grupo de controle" de animais infectados com *M. bovis* não-atenuados e não recebendo a bactéria atenuada. Neste contexto, o termo "reduzir/reduzido" significa uma redução de pelo menos 10%, preferencialmente 25%, ainda mais preferencialmente 50%, ainda mais preferencialmente de mais de 100% quando comparado com o grupo de controle como definido acima. Dessa forma, uma cepa de *M. bovis* atenuada, avirulenta é aquela adequada para incorporação em uma composição imunogênica, compreendendo uma bactéria *M. bovis* modificada viva.

[00026] Uma "quantidade eficaz" para fins da presente invenção, significa uma quantidade de uma composição imunogênica capaz de induzir uma resposta imune que reduz a incidência ou diminui a severidade da infecção por *M. bovis* em um animal. Particularmente, uma quantidade eficaz refere-se a 10E3 a 10E10, preferencialmente a 10E6 a 10E10 unidades de formação de colônia (CFU) por dose.

[00027] "Eficácia melhorada" tal que os sinais clínicos associados à

infecção por *M. bovis* e/ou à própria infecção por *M. bovis* foram reduzidos em comparação com vacinas atualmente disponíveis quando os vacinados são expostos a *M. bovis* ou sofrem infecção por cepas de *M. bovis* de tipo selvagem refere-se a uma redução da incidência ou da severidade de sinais clínicos da infecção por *M. bovis* em comparação com vacinas feitas a partir de cepas passadas como ensinado pela presente invenção com vacinas de *M. bovis* que estavam disponíveis antes desta invenção. Neste contexto, os animais não-vacinados ou vacinados com vacinas de *M. bovis* disponíveis antes da presente invenção terão sinais clínicos da infecção por *M. bovis* que são pelo menos 30%, e possivelmente até mais preferencialmente pelo menos 40%, ainda mais preferencialmente pelo menos 50%, ainda mais preferencialmente pelo menos 60%, ainda mais preferencialmente pelo menos 70%, ainda mais preferencialmente pelo menos 75%, ainda mais preferencialmente pelo menos 80%, ainda mais preferencialmente pelo menos 85%, ainda mais preferencialmente pelo menos 90%, e ainda mais preferencialmente pelo menos 95% mais severos ou prevalentes do que em animais que recebem uma administração de uma composição imunogênica de *M. bovis* conforme a presente invenção.

[00028] "Proteção de longa duração" deve referir-se à "eficácia melhorada" que persiste por pelo menos 3 semanas, mas mais preferencialmente pelo menos 6 meses, ainda mais preferencialmente pelo menos 1 ano, ainda mais preferencialmente pelo menos 2 anos de animais de corte, e pelo menos 6 meses, mais preferencialmente pelo menos 1 ano, ainda mais preferencialmente pelo menos 2 anos, ainda mais preferencialmente pelo menos 3 anos, e até mais preferencialmente pelo menos 4 anos de animais de leite. Tanto para animais de leite como para animais de corte, é mais preferencial que a proteção de longa duração deva persistir até a idade média na qual os animais de corte são vendidos para alimentação e idade na qual os

animais de leite concluem sua vida produtiva de ordenha.

[00029] O termo "em necessidade de tal administração" ou "em necessidade de tal tratamento de administração", como usado neste pedido significa que a administração/tratamento estão associados à elevação ou à melhora na saúde ou qualquer outro efeito medicinal positivo sobre a saúde dos animais que recebem a composição imunogênica conforme a presente invenção.

[00030] "Impressão digital de DNA", como usado neste pedido, refere-se à identificação rápida de cepas bacterianas realizada pela amplificação de DNA entre sequências de inserção e medida do padrão de produtos amplificados como descrito em WO2008-030619. Resumidamente, usando PCR e uma combinação de iniciadores opostos externamente desenhados contra sequências de inserção bacteriana (elementos transponíveis), padrões que são produzidos são únicos para um isolado de uma espécie bacteriana. Estes padrões então podem ser comparados para tais coisas como epidemiologia ou filogenia. Um método preferencial de impressão digital de DNA utiliza PCR e uma combinação de iniciadores opostos externamente desenhados contra sequências de inserção bacterianas únicas ou múltiplas. Tal método produz produtos de amplificação de IS adjacente. Uma vez que a amplificação por PCR é completa, os produtos são separados (gel de agarose) e os padrões de bandas são produzidos, de acordo com o peso molecular dos produtos de amplificação, que são únicos para um isolado de uma espécie bacteriana. O método preferencial é realizar PCR múltiplo usando iniciadores opostos externamente. PCR multiplex é uma variante de PCR que permite a amplificação simultânea de muitos alvos de interesse em uma reação pelo uso de múltiplos conjuntos de iniciadores. Naturalmente outros métodos de impressão digital com base molecular conhecidos na técnica também podem ser usados.

[00031] Uma "sequência de inserção" (IS) é uma sequência de DNA curta que atua como um elemento transponível. IS tem geralmente aproximadamente 700 a 2500 pb de tamanho, que é relativamente pequeno em comparação com outros tipos de elementos transponíveis. Elas codificam para proteínas implicadas na atividade de transposição, em que as proteínas catalisam a reação enzimática que permite a IS mover-se. Elementos de IS são únicos para uma espécie particular ou podem ser compartilhados entre grupos taxonômicos. Há normalmente múltiplas cópias destas sequências de inserção, mas são localizadas em posições únicas de um elemento transponível específico.

[00032] Dessa forma, de acordo com outro aspecto, a presente invenção relaciona-se ao uso de uma cepa de *M. bovis*, atenuada por múltipla passagem ou atenuação em série como descrita acima, como um remédio, preferencialmente como um remédio veterinário.

[00033] De acordo com outro aspecto da presente invenção, as cepas de *M. bovis* atenuadas como descrito acima podem ser usadas para a preparação de uma composição farmacêutica, como descrito neste pedido, para a profilaxia ou tratamento de infecções causadas por *M. bovis*. Como observado acima, aquelas composições farmacêuticas/composições de vacina podem ser usadas para o tratamento e/ou profilaxia de animais suscetíveis à infecção por *M. bovis*.

[00034] Em outro aspecto da presente invenção, a invenção é um método para o tratamento ou a profilaxia incluindo uma diminuição da incidência de infecção de tipo selvagem em um rebanho ou redução da severidade de sinais da infecção por *M. bovis* associada a animais infectados por *M. bovis* de tipo selvagem administrados com composições imunogênicas, conforme a presente invenção em comparação com animais que não são vacinados ou são vacinados com vacinas disponíveis antes da presente invenção, é fornecido.

Adicionalmente, a administração da vacina conforme a presente invenção reduz o número de animais em um rebanho que tornam-se infectados com *M. bovis*. Tal método geralmente envolve a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma cepa de *M. bovis* atenuada através dos métodos descritos acima, a um indivíduo ou rebanho de indivíduos em necessidade de tal tratamento. Preferencialmente, os sintomas clínicos são diminuídos em incidência ou severidade em pelo menos 10%, mais preferencialmente em pelo menos 20%, ainda mais preferencialmente em pelo menos 30%, ainda mais preferencialmente em pelo menos 40%, ainda mais preferencialmente em pelo menos 50%, ainda mais preferencialmente em pelo menos 60%, ainda mais preferencialmente em pelo menos 70%, ainda mais preferencialmente em pelo menos 80%, ainda mais preferencialmente em pelo menos 90%, e ainda mais preferencialmente em pelo menos 95% em comparação com animais que não são vacinados ou são vacinados com uma composição imunogênica de *M. bovis* que estava disponível antes da presente invenção, mas posteriormente infectado por *M. bovis* de tipo selvagem.

Breve Descrição das Figuras

[00035] Figura 1: Frequência de Recuperação de Cultura a partir de Amostras Nasais, de Amígdala e de Pulmão (Dias 0, 14, 28, 35 e Pós)

[00036] Figura 2: Frequência de Detecção por PCR de Amostras Nasais, de Amígdala e de Pulmão (Dias 0, 14, 28, 35 e Pós)

[00037] Figura 3: Escore de Grupo Médio para Anticorpos específicos para *M. bovis* a partir de Amostras de Soro (Dias 0, 14, 28, 35 e 42)

[00038] Figura 4: Comparação de Sorologia para Grupo Vac Viva I, II, III e sem- Vacina (SQ+IN somente)

[00039] Figura 5: Comparação de Sorologia para Vac Viva I usando Várias Vias de Administração

Descrição Detalhada das Modalidades Preferenciais

[00040] Os seguintes exemplos são representativos de modalidades preferenciais da presente invenção. É entendido que nada neste pedido deve ser tomado como uma limitação do escopo total da invenção.

Exemplo 1

[00041] Este Exemplo avaliou a eficácia de uma vacina de *M. bovis* vivo experimental usando dois modelos de desafio diferentes em uma espécie-alvo.

Materiais e Métodos

[00042] Trinta e cinco bezerros Holstein privados de colostro (CD) que variam em idade de 4 a 8 semanas de idade foram usados. Todos os animais satisfizeram os critérios de inclusão, ou seja, que apresentaram resultado negativo para *M. bovis* e estavam em boa saúde no momento do desafio. Os bezerros foram primeiro randomicamente destinados a 1 de 4 grupos. Os grupos 1 a 3 cada um continha 9 bezerros, e o Grupo 4 continha 8 bezerros. Os grupos 1 e 2 de bezerros foram vacinados com Vac Viva 1, que é uma cultura bruta de *M. bovis* 052823 isolado passada 106 vezes (05-2823-1A-3A P106+) (Designação na ATCC N° PTA-8694) enquanto os bezerros dos Grupos 3 e 4 foram vacinados somente com meios. A vacina isolada para os Grupos 1 e 2 foi obtida da erupção de doença que ocorre naturalmente e então passada 106 vezes serialmente em meios apropriados para *M. bovis*. A cultura foi cultivada 24 ± 2 horas a 37°C após inoculação com um volume apropriado da cultura de semente determinada antes do estudo. O isolado foi usado sem diluição. Foi encontrado que a concentração média pré e pós de vacinação era $2,1E9$ CFU/ml. A vacina foi administrada em doses de 2 ml subcutaneamente e em doses de 2 ml intranasalmente (1 ml em cada narina). Todos os bezerros do estudo foram desafiados com *M. bovis* virulento para induzir a infecção que

ocorre naturalmente e doença com os Grupos 1 e 3 recebendo uma dose de desafio maior e os Grupos 3 e 4 recebendo uma dose de desafio menor.

[00043] As doses e administrações da substância de teste são resumidas na Tabela 1.

Tabela 1

Grupo de Tratamentos							
Grupos	Animais/ grupos	Substância de Teste			Desafio		
		Artigo	Dose/ Via	Esquema de Administra ção	Material	Dose	Esquema de Administração
Grupo 1	9	<i>M. bovis</i> Vivo I	2 ml SQ e 2ml IN (1ml cada de narina)	Dias 0 e 14	<i>M. bovis</i> (Isolado Único Fresco)	Alta dose de material de desafio e 30 ml de PBS	Dia 29 (aproximadamente 4 semanas após vacinação)
Grupo 2	9	<i>M. bovis</i> Vivo I	2 ml SQ e 2ml IN (1ml cada de narina)	Dias 0 e 14	<i>M. bovis</i> (Isolado Único Fresco)	Baixa dose de material de desafio e 30 ml de PBS	Dia 29 (aproximadamente 4 semanas após vacinação)
Grupo 3	9	Somente Meios	2 ml SQ e 2ml IN (1ml cada de narina)	Dias 0 e 14	<i>M. bovis</i> (Isolado Único Fresco)	Alta dose de material de desafio e 30 ml de PBS	Dia 29 (aproximadamente 4 semanas após vacinação)
Grupo 4	8	Somente Meios	2 ml SQ e 2ml IN (1ml cada de narina)	Dias 0 e 14	<i>M. bovis</i> (Isolado Único Fresco)	Baixa dose de material de desafio e 30 ml de PBS	Dia 29 (aproximadamente 4 semanas após vacinação)

[00044] Cotonetes nasais e amostras de sangue foram tomados nos Dias 0, 14, 28, 35 e 42. Na necropsia, amostras dos pulmões foram tomadas, cotonetes de amígdala foram coletados de todos os bezerros e cotonetes de articulações foram tomados de animais com anormalidades clínicas. Adicionalmente, amostras foram tomadas de outras posições em certos animais mostrando envolvimento de área. Em todos os casos, três cotonetes estéreis foram esfregados em volta das regiões, tão assepticamente quanto possível, por alguns segundos e então removidos. Dois dos esfregões foram colocados em recipientes de transporte individuais com meios de comunicação e cada um foi colocado em um recipiente de transporte sem meios. A tabela 2 resume as amostras tomadas de cada bezerro.

Tabela 2

Dia	Evento	Amostras	Prova
-42 a 0	Observações Gerais (Diariamente)	--	--
Aprox - 35	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
		Entalhe de orelha	BVDV (IHC)
0 a 28	Avaliação clínica	--	--
0	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
	1ª Vacinação	--	--
14	Avaliação do sítio de injeção	--	--
	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
	2ª Vacinação	--	--
28	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
	Avaliação do sítio de injeção	--	--

29	Desafio	--	--
28 a 43	Observação Clínica (Diariamente)	--	--
35	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
42	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
43	Necrópsia e Patologia Total	--	--
	Amostras coletadas (Pós)	Cotonete de amígdala (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Tecido Pulmonar (Conservado)	<i>M. bovis</i> (IHC)
		Tecido Pulmonar (Fresco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Cotonetes de articulação (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)

Prova

[00045] Para a prova microbiológica, cotonetes foram colocados nos meios de transporte e amostras de tecido foram embarcadas para isolamento de *M. bovis*. Resumidamente, cotonetes foram agitados em 5ml de caldo seletivo para Micoplasma. Uma pequena amostra (aproximadamente 5 mm) foi cortada do tecido de pulmão e homogeneizada em 2ml de meios de Micoplasma. 100 µl de homogeinato foram adicionados ao caldo seletivo de Micoplasma. As culturas foram incubadas a 37C/CO₂ a 5%. Após 4 a 14 dias, o caldo foi examinado para crescimento e subcultivado em placas para isolamento. Todas as amostras de subculturas positivas foram armazenadas a -70C.

[00046] Para PCR, cotonetes de cada bezerro não colocados em meios de transporte e amostras de tecido foram enviados para extração de DNA e prova por PCR usando iniciadores e sondas específicas para o gene *uvrC* de *M. bovis*. Os resultados da prova de PCR foram expressos como positivos ou negativos para a detecção de DNA de *M. bovis*.

[00047] Para a prova de sorologia, amostras de soro foram testadas usando um ELISA comercialmente disponível (Biovet, Canada) usando o protocolo fornecido no conjunto de teste. Os resultados de ELISA foram

expressos como leituras de Densidade Ótica (OD). As OD's de amostra foram comparadas ao nível de Positividade (Média ODp x 0,3) estabelecido pelo controle positivo incluído no conjunto de teste. Resultados positivos então foram interpretados pela seguinte escala:

Intervalo	Interpretação
OD da amostra < Nível de Positividade	Negativo (0)
Nível de Positividade < OD da Amostra < $1,75 * \text{Nível de Positividade}$	+1
$1,75 * \text{Nível de Positividade} < \text{OD da Amostra} < 2,3 * \text{Nível de Positividade}$	+2
$2,3 * \text{Nível de Positividade} < \text{OD da Amostra} < 3 * \text{Nível de Positividade}$	+3
OD da Amostra < $3 * \text{Nível de Positividade}$	+4

[00048] Para prova de histopatologia/IHC, tecidos fixados em formalina foram testados por lâmina marcada com hematoxilina/eosina e imunohistoquímica usando anticorpos monoclonais específicos para *M. bovis*.

[00049] Para prova clínica, observações diárias gerais foram transportadas feitas a partir do Dia 0 ao Dia 28, e então a observação clínica diária foi feita do Dia 28 à eutanásia e necrópsia. A observação clínica e geral que fora da normalidade foi observada e documentada.

[00050] Na necrópsia, a cavidade torácica e a traqueia foram examinadas para cada bezerro e observações grossas registradas. Os pulmões e aproximadamente 15,24 centímetros da traqueia de cada bezerro foram removidos intactos para exame adicional e coleta de amostra. Para cada conjunto de pulmões, as superfícies de pulmão dorsal e ventral foram fotografadas com uma marcação de orelha

apropriada ao lado de cada vista.

[00051] Para patologia pulmonar, cada lobo pulmonar foi examinado por visualização e por palpação a fim de determinar quanta patologia estava presente (como porcentagem) por cada lobo pulmonar devido a *M. bovis*. Cada porcentagem de lobo pulmonar foi então pesada e somada para determinar a porcentagem do pulmão total com a patologia.

[00052] Patologia de articulação foi testada pelo exame de articulações afetadas e registro de observações grossas.

[00053] Para fins de análise de dados, os dados foram resumidos. A redução porcentual de sintomas clínicos e a patologia grossa foram calculadas usando a seguinte fórmula: % de Redução = $[1 - (\text{Tratamento}/\text{Não Tratamento})] * 100$.

[00054] Adicionalmente, 1 animal de cada um dos grupos 2 e 3, e 2 animais do grupo 4 foram removidos por razões humanas no Dia 37.

Resultados

[00055] Avaliações clínicas pré-desafio foram feitas do Dia 1 ao Dia 26. Fezes moles/aquosas, depressão, orelha caída, e letargia foram observados durante esta fase do estudo. Cuidado veterinário apropriado foi administrado. Nenhuma reação de sítio adversa ou sintomas clínicos específicos de *Mycoplasma* foram observados em quaisquer grupos em qualquer dia de observação. Avaliações clínicas pós-desafio foram feitas do Dia 27 a 43. Tosse, respiração difícil, depressão, anorexia, articulações inchadas, coxeadura e orelha caída estiveram em todas as observações clínicas observadas durante esta fase do estudo. A incidência de escores clínicos durante o período pós-desafio é resumida abaixo na Tabela 3. O grupo 1 teve dois de nove bezerros afetados com pelo menos um sinal clínico de infecção, dois que foram afetados com sinais respiratórios e aquele que foi afetado com sinais da infecção nas articulações. O grupo 3 teve todos os bezerros afetados com pelo

menos um sinal clínico, sete bezerros afetados com sinais respiratórios e três bezerros afetados com sinais de infecção em suas articulações. O grupo 2 teve quatro de nove bezerros afetados por pelo menos um sinal clínico, nenhum bezerro afetado com sinais somente respiratórios, e quatro bezerros com sinais de infecção em suas articulações. O grupo 4 teve sete bezerros com pelo menos um sinal clínico, um com sinais respiratórios, e sete com sinais de infecção em suas articulações.

Tabela 3

Grupo		Todos (Respiratório + Articulação + Outros)			Respiratório			Articulação		
		Afetado	Frequência	% de Redução	Afetado	Frequência	% de Redução	Afetado	Frequência	% de Redução
1	Vac/Alto	2/9	22%	78%	2/9	22%	72%	1/9	11%	67%
3	Sem-Vac/Alto	9/9	100%		7/9	78%		3/9	33%	
2	Vac/Baixo	4/9	44%	50%	0/9	0%	100%	4/9	44%	50%
4	Sem-Vac/Baixo	7/8	88%		1/8	13%		7/8	88%	

Grupo 1 = Vacina/Alto Desafio Respiratório

Grupo 2 = Vacina/Baixo Desafio Respiratório

Grupo 3 = Sem-Vacina/Alto Desafio Respiratório

Grupo 4 = Sem-Vacina/Baixo Desafio Respiratório

[00056] Os pulmões foram coletados na necrópsia e observados para lesões associadas com infecção por *M. bovis*. Os animais exibiram variabilidade em características patológicas, tais como consolidação e formação nodular. Resultados do envolvimento pulmonar foram expressos como uma porcentagem usando um sistema de marcação refletindo a porcentagem do pulmão total com a patologia grossa associada com a infecção por *M. bovis*. Em alguns casos, a determinação de porcentagem de pulmão foi impedida por adesões ou natureza atípica de lesões. A tabela 4 exibe as razões de indivíduos

mostrando qualquer quantidade de lesões pulmonares e variação percentual/envolvimento pulmonar percentual. Para os escores de patologia pulmonar, o grupo 3 teve a maioria dos bezerros afetados (9/9) e o grupo 2 teve o menor número de bezerros afetados (2/9).

Tabela 4: Sumário dos Escores de Patologia de Pulmão

Grupo		Patologia Pulmonar			
		Afetado	% de Faixa	% da MÉDIA ± PADRÃO	% de Redução
1	Vac/Alto	6/9	0,8 a 26,7	4,0±8,6	33%
3	Sem-Vac/Alto	9/9	0,4 a 23,9	6,0±7,4	
2	Vac/Baixo	2/9	0,4 a 2,0	0,3±0,7	96%
4	Sem-Vac/Baixo	6/8	0,4 a 36,3	7,2±12,3	

[00057] Na necrópsia, articulações de animais que anteriormente exibiram sintomas clínicos (inchaço ou coxeadura) foram examinadas para patologia grossa. Áreas afetadas variaram por animal e podem ter envolvido o carpo, jarrete, patela, machinho e/ou cotovelo. Animais apresentaram-se com inchaço grossa, fluido sinovial aumentado, fluido de aparência anormal e espessamento da cápsula articular. Em bezerros afetados mais severamente, fibrina estava presente onde houve erosão da superfície articular. Amostras de fluido articular e/ou cotonetes superficiais foram testados por cultura para a presença de *M. bovis*. A presença de características patológicas grossas na articulação é resumida na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5: Presença de Características Patológicas Grossas na Articulação (0 = Normal; 1 = Anormal)

Grupo	Animais	Articulação	Inchamento Grosso	Volume de Fluido Sinovial	Aparência do Fluido Sinovial	Presença de Fibrina	Cápsula Articular	Superfície Articular	Deteção de <i>M. bovis</i>
1	5982	Patela Direita	1	1	1	1	1	1	Sim
1	5887	Patela Esquerda	NR	1	0	0	0	0	Não
1	5007	Patela Direita	NR	1	0	0	0	0	Não
1	0007	Machinho posterior direito	0	0	0	0	0	0	Não
2	5987	Cotovelo direito	0	0	0	0	0	0	Sim
2	5989	Jarrete Direito	NR	1	NR	1	1	0	Sim
3	5995	Jarrete Direito	1	1	1	1	1	0	Sim
3	5990	Patela Esquerda	0	1	1	0	0	0	Sim
4	5985	Machinho Posterior Esquerdo	1	1	1	0	1	0	Sim
4	5991	Machinho Posterior Esquerdo	1	0	1	0	1	0	Não
4	0004	Patela Esquerda	1	1	NR	1	1	0	Sim
4	0000	Carpo Esquerdo	1	1	0	0	0	0	Sim
4	0011	Cotovelo direito	1	1	1	0	0	0	Sim
td4	0011	Patela Direita	1	1	1	0	1	0	Sim
4	0013	Patela Esquerda	0	0	1	0	0	0	Não
4	6015	Jarrete Direito	0	1	1	1	0	0	Sim

Grupo 1=Vacina/Alto Desafio Respiratório; 2=Vacina/Baixo Desafio Respiratório; 3=Sem-Vacina/Alto Desafio Respiratório; 4=Sem-Vacina/Baixo Desafio (NR=Não Registrado)

[00058] As passagens nasais foram amostradas pelo cotonete nos Dias 0, 14, 28, e 35 e então amostradas na necrópsia (Dia 43). Além disso, durante a pós-morte, amostras de amídalas foram tomadas pelo cotonete e o tecido pulmonar representativo foi recuperado. As figuras 1 e 2 mostram a frequência de recuperação por cultura seletiva para *Mycoplasma* ou frequência de detecção por *M. bovis* por PCR específica. Como mostrado na figura 1, houve recuperação de 100% de todos os grupos quando as amídalas foram amostradas pós-necrópsia. Houve recuperação de 100% nos grupos 1 e 3 nos pulmões pós-necrópsia. O grupo 2 recuperou a menor quantidade dos pulmões (aproximadamente 60%) e o grupo 4 recuperou aproximadamente 90%. Nenhum grupo mostrou a recuperação de bactérias *M. bovis* até amostras tomadas nasalmente no dia 35 do estudo, e o único grupo a mostrar recuperação no dia 35 foi o grupo 4 (25%). Todos os grupos exceto o grupo 2 mostraram recuperação nas amostras nasais pós-necrópsia.

Tabela 6: Sumário de PCR e Sorologia

Dia		0			14			28			35			42 (ou Pós)										
Amostra		Nasal	Nasal	Soro	Nasal	Nasal	Soro	Nasal	Nasal	Soro	Nasal	Nasal	Soro	Nasal	Nasal	Soro	Amídala	Amídala	Amídala	Pulmão	Pulmão	Pulmão	Articulação	Articulação
Grupo	Cosby ID	Cultura	PCR-uvrC	ELISA	Cultura	PCR-uvrC	ELISA	Cultura	PCR-uvrC	ELISA	Cultura	PCR-uvrC	ELISA	Cultura	PCR-uvrC	ELISA	Cultura	PCR-uvrC	PCR-Vac	Cultura	PCR-uvrC	PCR-Vac	Cultura	PCR-uvrC
1	5981	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5986	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5998	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	5999	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6003	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6007	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6008	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6009	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	6012	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5982	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5983	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5984	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5987	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5988	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5989	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5990	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5992	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	5994	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5993	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5995	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5996	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	5997	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6000	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6001	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6002	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6010	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	6014	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5985	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	5991	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6004	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6005	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6011	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	6015	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Cultura

0 = Sem-crescimento de *M. bovis*

1 = Crescimento de *M. bovis*

M = Misturado/ou outro

PCR

0 = Negativo para *M. bovis*

1 = Positivo para *M. bovis*

ELISA

0 = Negativo

1 = Positividade para 1,75x

2 = 1,75x a 2,3x

3 = 2,3x a 3,0x

4 = 3,0x ou maior

NS = Sem-amostra

NT = Não-Testado

[00059] Todas as amostras foram testadas no ELISA Biovet para *M. bovis* para monitorar a resposta sorológica a *M. bovis*. Soroconversão foi marcada de acordo com os multiplicadores agrupados de ODs de positividade.

A seguinte tabela mostra os escores sorológicos médios detectados de cada grupo no Dia 0, 14, 28, 35 e 42. A figura 3 mostra o escore de grupo médio de anticorpos específicos para *M. bovis* de amostras de soro. Soroconversão indicando resposta imune humoral eficaz foi detectada em não mais do que 14 dias após uma dose de vacina, e boa duração desta resposta imune foi evidente pela resposta sorológica mensurável ao *M. bovis* por pelo menos 42 dias após uma vacinação e 28 dias após duas doses de vacina. O escore do grupo 1 foi constantemente mais alto do que todos outros grupos começando no dia 28. Os grupos 1 e 2 foram iguais no dia 14 (escore de ELISA 1,5). O grupo 4 foi o mais baixo dos dias 14 a 35, e veio em terceiro

(aproximadamente 2,2) no dia 42.

Conclusões

[00060] Este estudo avaliou a eficácia de uma vacina de *M. bovis* vivo em bezerros dada como duas doses, dada tanto subcutaneamente como intranasalmente, e modelos de desafio nas espécies-alvo. O modelo de desafio incluiu uma administração respiratória alta e uma administração respiratória baixa. O estudo também avaliou eficácia, início da imunidade e duração da imunidade por uma avaliação indireta, soroconversão ou resposta imune humoral após uma dose única e duas doses de vacina. O início da imunidade e a duração da imunidade após vacinação foram como provados.

[00061] Ambos isolados de *M. bovis* de desafio e vacina originaram-se de animais diferentes infectados naturalmente. O isolado usado como o desafio foi anteriormente mostrado causar a doença tanto de pulmão como de articulação durante o desafio experimental e predominou em estudos de desafio isolados mistos. O isolado de vacina é um isolado de alta passagem (passagem 106) originalmente derivado de uma amostra diagnóstica. Além disso, os genótipos dos isolados de desafio e de vacina foram mostrados ser dissimilares usando o método de impressão digital descrito neste pedido.

[00062] Dentro dos grupos desafiados de alto volume respiratório (1 e 3), uma redução de sintomas clínicos respiratórios (72%) e patologia pulmonar (33%) foi observada no grupo vacinado. A maioria dos sintomas clínicos respiratórios no grupo não-vacinado ocorreu entre os dias 2 e 3 pós-desafio. Como mostrado na Tabela 3, a vacina também reduziu a ocorrência de doença articular devido a *M. bovis*.

[00063] Dentro dos grupos desafiados de baixo volume respiratório (2 e 4), uma redução (96%) na patologia pulmonar foi observada no grupo vacinado. Além disso, o grupo vacinado mostrou uma redução apreciável (50%) de sintomas clínicos articulares.

[00064] Prova de laboratório de amostras de pulmão (IHC, PCR e cultura) e amostras articulares (PCR e cultura) concordou com a patologia grossa na maioria dos exemplos. Discrepâncias podem ser atribuídas à distribuição bacteriana no sítio de amostragem ou entre amostras submetidas à prova. A vacina isolada não foi detectada em quaisquer amostras de pulmão testadas por um ensaio de PCR experimental desenhado para detectar o candidato de vacina e não o desafio isolado.

[00065] O novo candidato de vacina de *M. bovis* vivo atenuado de alta passagem (05-2823 P106) fornecido tanto através da via intranasal como via subcutânea administrado 2 vezes com um intervalo de 2 semanas entre vacinações foi mostrado ser seguro e eficaz fornecendo uma redução de sinais da infecção por *M. bovis* tanto incluindo sintomas clínicos como patologia associada (respiratória e articular) à infecção por *Mycoplasma bovis* em bezerros privados de colostro usando várias condições de desafio. A vacina de *M. bovis* e a composição imunológica foram também eficazes na estimulação de um início de imunidade não mais do que 14 dias após uma dose única e com uma duração de pelo menos 42 dias após a dose única.

Exemplo 2

[00066] O objetivo desta investigação foi determinar a segurança e a eficácia de três candidatos de vacina viva.

Materiais e Métodos

[00067] Semanas de idade e foram divididos em 6 grupos. Como mostrado na Tabela 7, o grupo 1 foi compreendido de 10 animais, que foram vacinados com Vacina de *M. bovis* Vivo I no dia 0 (D0) e D14 do estudo. O grupo 1 foi vacinado subcutaneamente com 2 ml e intranasalmente com 2 ml em D0 e D14. O grupo 2 foi compreendido de 10 animais e foi vacinado subcutaneamente com 2 ml de Vacina de *M. bovis* Vivo I em D0 e D14 do estudo. O grupo 3 foi compreendido de 9

bezerros vacinados com Vacina de *M. bovis* Vivo I em D0 e D14. O grupo 3 foi vacinado intranasalmente com 2 ml. O grupo 4 foi um controle e não foi administrado vacina. O grupo 5 foi compreendido de 2 bezerros que foram vacinados com Vacina de *M. bovis* Vivo II. O grupo 5 foi vacinado subcutaneamente com 2 ml e intranasalmente com 2 ml em D0 e D14. O grupo 6 foi compreendido de dois bezerros que foram administrados com Vacina de *M. bovis* Vivo III. Os bezerros no Grupo 6 foram administrados 2 ml subcutaneamente e 2 ml intranasalmente em D0 e D14. Todos os grupos foram posteriormente desafiados com 120 ml do material de desafio. Todos os animais foram desafiados em D28.

[00068] Como observado na Tabela 8, cotonetes nasais foram coletados de todos os bezerros nos Dias 0, 14, 27, 35 e 41. Na necrópsia, cotonetes de amígdala foram coletados de todos os bezerros. Cotonetes de articulações foram tomados de animais com anormalidades clínicas. Além disso, amostras foram tomadas de outras posições em certos animais mostrando envolvimento de área. Sangue foi coletado de todos os bezerros nos Dias 0, 14, 27, 35 e 41. Sangue foi coletado assepticamente de uma veia patela de cada bezerro. Após necrópsia, os pulmões foram marcados para lesões de pulmão.

Tabela 7: Tratamentos dos Grupos

	Animais/grupo	Substância de Teste			Desafio		
		Artigo	Dose/Via	Esquema de Administração	Material	Dose	Esquema de Administração
Grupo 1	10	<i>M. bovis</i> Vivo I (05-2823 P106	2 ml SQ e 2 ml IN	Dia 0 e 14	<i>M. bovis</i>	material de desafio com uma lavagem em 5 ml de PBS	Dia 28 (aprox. 4 semanas após vacinação)
Grupo 2	10	<i>M. bovis</i> Vivo I (05-2823 P106	2 ml SQ	Dia 0 e 14	<i>M. bovis</i>	material de desafio com uma lavagem em 5 ml de PBS	Dia 28 (aprox. 4 semanas após vacinação)
Grupo 3	9	<i>M. bovis</i> Vivo I (05-2823 P106	2 ml IN	Dia 0 e 14	<i>M. bovis</i>	material de desafio com uma lavagem em 5 ml de PBS	Dia 28 (aprox. 4 semanas após vacinação)
Grupo 4	9	média somente	2 ml SQ e 2 ml IN	Dia 0 e 14	<i>M. bovis</i>	material de desafio com uma lavagem em 5 ml de PBS	Dia 28 (aprox. 4 semanas após vacinação)
Grupo 5	2	<i>M. bovis</i> Vivo II (05-249 P102	2 ml SQ e 2 ml IN	Dia 0 e 14	<i>M. bovis</i>	material de desafio com uma lavagem em 5 ml de PBS	Dia 28 (aprox. 4 semanas após vacinação)
Grupo 6	2	<i>M. bovis</i> Vivo III (05-1902 P106	2 ml SQ e 2 ml IN	Dia 0 e 14	<i>M. bovis</i>	material de desafio com uma lavagem em 5 ml de PBS	Dia 28 (aprox. 4 semanas após vacinação)

Tabela 8: Esquema de Amostra

Dia	Evento	Amostras	Prova
-42 a 0	Observações Gerais (Diariamente)	--	--
Aprox -35	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
		Entalhe de orelha	BVDV (IHC)
0 a 28	Avaliação clínica	--	--
0	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
	1ª Vacinação	--	--
14	Avaliação do sítio de injeção	--	--
	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
	2ª Vacinação	--	--
27	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
28	Desafio	--	--
29 a 42	Observação Clínica (Diariamente)	--	--
35	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)

41	Amostras coletadas	Cotonete nasal (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Sangue (SST)	<i>M. bovis</i> (ELISA)
42	Necrópsia e Patologia Grossa	--	--
	Amostras coletadas (Pós)	Cotonete de amígdala (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Tecido Pulmonar (Conservado)	<i>M. bovis</i> (IHC)
		Tecido Pulmonar (Fresco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)
		Cotonetes de articulação (Úmido/Seco)	<i>M. bovis</i> (Cultura/PCR)

Resultados e Discussão

Sinais Clínicos Pré-desafio

[00069] Avaliações clínicas foram feitas do Dia -1 até Dia 28. Fezes moles/aquosas, descarga ocular, depressão e letargia foram observações clínicas notadas durante esta fase do estudo, e não foram atribuídas a um efeito da vacinação. A observação de sítios de injeção não registrou reações de sítio adversas exceto o bezerro 6134 (grupo 6) que mostrou inchaço no 1º sítio de injeção no Dia 14.

Sinais Clínicos Pós-desafio

[00070] Observações clínicas foram feitas do Dia 28 até Dia 42. Tosse, respiração forçada, depressão, articulações inchadas, coxeadura e orelha caída foram observações clínicas notadas durante esta fase do estudo. Sinais clínicos foram divididos em três tipos (respiratório, articular e outro) típicos de infecção por *Mycoplasma bovis*. Sinais respiratórios incluíram tosse, respiração rápida/difícil e descarga nasal. Sinais articulares incluíram articulações inchadas e coxeadura. Outros sinais incluíram orelha caída, cabeça caída, depressão e anorexia. A tabela 9 exibindo resultados individuais pode ser encontrada abaixo:

Tabela 9

	DPC	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Grupo		28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
1	6116						5	4,5	4,5	4,5	4,5					
1	6123								4,7	4	4,5	4,5,8				
1	6124										4,5	1,4,5	4,5,8	4,5	4,5	4,5
1	6139									4,5	1,4,5	4,5	4,5	4,5	1,4,5,8	4,5
1	6140								4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
1	6145						5	4,5	4,5	4,5	4,5					
1	6151					5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5,8				
1	6152							4	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
1	6153															
1	6156						1			4		4,5	4,5	4,5		
2	6117							4	4,5	4,5,8	4,5					
2	6118		2													
2	6119										4			4,5	4,5	
2	6125					5	5,8	4,5,6,8	4,5	4,5	4,5	4,5,8				

Grupo	DPC	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
	⊆	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
2	6127					5	5	4,5	4,5	4,5	4,5					
2	6128						5	4,5	4,5	4,5	4,5					
2	6130											4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
2	6133							4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5,8	4,5
2	6136						4	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
2	6144							4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
3	6129					5	5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5				
3	6132						5	4,5	4,5	4,5	4,5					
3	6135						5	4,5	4,5	4,5	4,5					
3	6138															
3	6141								4,5	4,5		4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
3	6142									4,5	4	4,5	4,5	4,5	4,5,8	4,5,8
3	6154									4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5	4,5
3	6158													4,5	4,5	4,5
3	6159								4,5	4,5,8	4,5					
4	6120					5		4,5	4,5	4,5,8	4,5,8					
4	6126					5	5	4,5	4,5	4,5,8	4,5,8					
4	6131							8	4	4,5,8	4,5,8					
4	6143					5	1,5	4,5	4,5	4,5,8	4,5,8					
4	6146					2,5,8	2,4,5,8									
4	6147							4,5	4,5	4,5,8	4,5,8					
4	6150					1	1	4,5	4,5	1,4,5	4,5,8					
4	6155				5	5	4,5,8									
4	6157		1,2	2	2	2,8	1,2,8									
5	6122															
5	6137															
6	6121															
6	6134															

Chave para Sinal Clínico:

1 Tosse

2 Respiração rápida (difícil)

3 Descarga nasal

4 Inchaço Articular

5 Coxeio

6 Orelha Caída

7 Cabeça Caída

8 Depressão

9 Anorexia

A Diarreia

B Descarga Ocular

C Laceração da Pata

Caixa Preta = Animal removido do estudo

Tabela 10 - Incidência de Escores Clínicos durante o período Pós-

desafio

Grupo		Respiratório			Articular			Remoção Precoce		
		Afetado	Frequência	% de Redução	Afetado	Frequência	% de Redução	Afetado	Frequência	% de Redução
1	Vac Viva I (SQ+IN)	3/9	33%	0%	6/9	67%	33%	4/9	44%	56%
2	Vac Viva I (SQ)	0/9	0%	100%	7/9	78%	22%	4/9	44%	56%
3	Vac Viva I (IN)	0/9	0%	100%	5/8	63%	38%	3/8	38%	63%
5	Vac Viva II (SQ+IN)	0/2	0%	100%	0/2	0%	100%	0/2	0%	100%
6	Vac Viva III (SQ+IN)	0/2	0%	100%	0/2	0%	100%	0/2	0%	100%
4	Sem vacina	2/6	33%		6/6	100%		6/6	100%	

[00071] A tabela 10 é subdividida em observações clínicas respiratórias e articulares confirmadas (cultura e/ou PCR) típicas de infecção por *Mycoplasma bovis*. Além disso, as taxas de remoção precoce devido ao envolvimento severo articular são informadas.

Patologia Pulmonar

[00072] Na necropsia, os pulmões foram coletados e observados para lesões associadas com *M. bovis*. Os animais exibiram variabilidade em características patológicas, tais como consolidação e formação nodular. Os resultados do envolvimento pulmonar foram expressos como percentual usando um sistema de marcação que reflete a porcentagem do pulmão total com a patologia grossa associada com a infecção por *Mycoplasma bovis*. Em alguns casos, a determinação de percentual de pulmão foi impedida por adesões ou natureza atípica de lesões. Abaixo está uma tabela com as proporções de indivíduos exibindo qualquer quantidade de lesões pulmonares e variação percentual/envolvimento pulmonar percentual médio.

Tabela 11 - Sumário de Escore de Patologia de Pulmão

Grupo		Patologia de Pulmão			
		Afetado	% de Variação	% Média de Lesão	% de Redução de Lesão
1	Vac Viva I (SQ+IN)	7/9	0,2 a 20	1,0 ± 0,9	86%
2	Vac Viva I (SQ)	9/9	0,4 a 12,5	2,8 ± 3,8	61%
3	Vac Viva I (IN)	5/8	0,2 a 39,2	6,3 ± 13,5	13%
5	Vac Viva II (SQ+IN)	1/2	N/A	0,2 ± 0,3	98%
6	Vac Viva III (SQ+IN)	0/2	N/A	0,0	100%
4	Sem-vacina	6/6	2,0 a 19,5	7,2 ± 6,9	

Patologia Articular

[00073] Na necrópsia, articulações de animais que anteriormente exibiram sintomas clínicos (inchação e/ou coxeadura) foram examinadas para a patologia grossa. Áreas afetadas variaram por animal e podem envolver carpo, jarrete, patela, machinho e/ou cotovelo. Animais apresentaram inchação total, fluido sinovial aumentado, fluido de aparência anormal e espessamento da cápsula articular. Em bezerros afetados mais severamente, fibrina estava presente onde houve erosão da superfície articular. Amostras de fluido articular e/ou cotonetes superficiais foram testados por cultura e PCR para a presença de *Mycoplasma bovis*. Vacinação usando qualquer uma das vacinas vivas atenuadas reduziu com sucesso os números totais de bezerros afetados.

Tabela 12 - Incidência de Articulações Clínicas Confirmadas em Laboratório

Grupo	de Total Animais Afetados	Anterior Direita				Anterior Esquerda				Posterior Direita				Posterior Esquerda			
		Machinho	Joelho	Cotovelo	Ombro	Machinho	Joelho	Cotovelo	Ombro	Machinho	Jarrete	Patela	Quadril	Machinho	Jarrete	Patela	Quadril
1	6/9	0%	44%	11%	0%	11%	22%	0%	0%	11%	11%	11%	0%	33%	11%	22%	0%
2	7/9	29%	29%	0%	0%	29%	86%	0%	0%	29%	29%	14%	0%	57%	14%	14%	0%
3	5/8	0%	38%	0%	0%	0%	13%	0%	0%	13%	0%	13%	0%	13%	13%	25%	0%
4	6/6	50%	83%	33%	0%	50%	100%	0%	0%	67%	17%	0%	0%	83%	0%	0%	0%
5	0/2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
6	0/2	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%

Grupo 1=Vac I (SQ+IN); 2=Vac I (somente SQ); 3=Vac I (somente IN); 4=Sem-Vac; 5=Vac II (SQ+IN); 6=Vac III (SQ+IN)

Nota: Uma amostra foi informada como confirmada em laboratório se PCR e/ou Cultura foi positiva para *M. bovis*.

Detecção por PCR de *M. bovis* em Amostras Nasais, de Amígdala e de Pulmão

[00074] As passagens nasais foram amostradas de cada animal por cotonete nos Dias 0, 14, 27, 35 e 41 ou Dia da Necrópsia. Além disso, durante a pós-morte, as amostras de amígdalas foram tomadas pelo cotonete e tecido representativo de pulmão foi recuperado. As seguintes tabelas mostram a frequência de detecção usando PCR em tempo real visando um marcador geral de *M. bovis* (uvrC). Além disso, a amígdala e o tecido de pulmão foram analisados usando um ensaio de PCR de ponto final recentemente desenvolvido visando marcadores não encontrados no isolado de desafio de *M. bovis* mas encontrados em todos os candidatos de vacina. Como esperado, a PCR detectou a vacina de *M. bovis* e/ou o micro-organismo de desafio em várias amostras de cotonetes nasais.

Tabela 13 - Frequência de Detecção por PCR de *M. bovis* em Amostras de Cotonetes Nasais

Grupo		n=	Dia de Teste				
			D0	D14	D27	D35	Pós
1	Vac Viva I (SQ+IN)	9	0%	33%	0%	11%	22%
2	Vac Viva I (SQ)	9	0%	0%	0%	22%	0%
3	Vac Viva I (IN)	8	0%	0%	13%	0%	25%
4	Sem-vacina	6	0%	0%	0%	50%	33%
5	Vac Viva II (SQ+IN)	2	0%	0%	0%	50%	50%
6	Vac Viva III (SQ+IN)	2	0%	0%	0%	0%	100%

Grupo 1=Vac I (SQ+IN); 2=Vac I (somente SQ); 3=Vac I (somente IN); 4=Sem-Vac; 5=Vac II (SQ+IN); 6=Vac III (SQ+IN)

Nota: Detecção por PCR em tempo real visando um marcador geral de *M. bovis* (uvrC).

Tabela 14 - Frequência de Detecção por PCR (ensaio de *M. bovis* Geral e Não-desafio) de Amostras de Tecido Pulmonar e Amígdala

Grupo	n=	Amígdala		Pulmão	
		Geral	Não-Desafio	Geral	Não-Desafio
1 Vac Viva I (SQ+IN)	9	100%	100%	67%	11%
2 Vac Viva I (SQ)	9	100%	0%	100%	0%
3 Vac Viva I (IN)	8	100%	100%	13%	0%
4 Sem-vacina	5	100%	0%	100%	0%
5 Vac Viva II (SQ+IN)	2	100%	100%	50%	0%
6 Vac Viva III (SQ+IN)	2	100%	100%	50%	0%

Grupo 1=Vac I (SQ+IN); 2=Vac I (somente SQ); 3=Vac I (somente IN); 4=Sem Vac; 5=Vac II (SQ+IN); 6=Vac III (SQ+IN)

Nota: **Geral** = Detecção por PCR em tempo real visando um marcador geral

de *M. bovis* (uvrC); **Não-desafio** = Detecção por PCR de ponto final visando

marcadores não encontrados no isolado de desafio em *M. bovis* mas encontrados em todos os candidatos de vacina.

[00075] Novamente, como esperado, PCR detectou com sucesso a vacina viva atenuada na amígdala após vacinação intranasal, ao passo que o microrganismo de desafio foi detectado em uma alta porcentagem tanto em amostras de pulmão como de amígdala.

Sorologia de *M. bovis*

[00076] Todas as amostras foram testadas no ELISA *M. bovis* Biovet para monitorar a resposta sorológica a *M. bovis*. Soroconversão foi marcada de acordo com os multiplicadores agrupados de ODs de positividade. As seguintes tabelas mostram escore sorológico médio detectado de cada grupo nos Dias 0, 14, 27, 35 e pós (o pós representa uma faixa de dias de estudo de 37 a 41 devido à remoção precoce de

certos animais). A soroconversão vista após vacinação reforça a conclusão que estas novas vacinas realmente provocam uma resposta imune adequada em animais vacinados, tais como bezerros com início rápido e duração longa (ver figura 4).

Discussão

[00077] O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia de três novas e experimentais vacinas de *Mycoplasma bovis* vivo incluindo a vacina (05-2823 P106) (PTA-8694) usando várias vias de administração de 2mL (SQ, IN, SQ+IN) quatorze dias à parte e um modelo de desafio dual nas espécies alvo. O modelo de desafio usou administração através do trato respiratório com a adição de uma administração parenteral. Além disso, dois outros candidatos de vacina viva (05-249 P102 (PTA-8696) e 05-1902-1 P106 (PTA-8695)) foram avaliados para a eficácia usando somente a via SQ+IN.

[00078] Os isolados de *Mycoplasma bovis* de desafio e candidatos à vacina originaram-se de diferentes fazendas naturalmente infectadas. Foi mostrado anteriormente que o procedimento usando um volume total de 120 mL do isolado de desafio quando administrado causava tanto a patologia de pulmão como a doença articular durante o desafio experimental e predominou em estudos de desafio de isolados mistos. Os candidatos de vacina viva são isolados de alta passagem originalmente derivados de amostras diagnósticas. A alta passagem dos candidatos de vacina foi realizada pelo envolvimento de diluição limitante em série em meios apropriados para *Micoplasma*. Foi observado que o candidato de vacina de alta passagem 05 2823 P106 demonstrou crescimento restrito em algumas formulações de ágar seletivas para *Micoplasma*, enquanto o parental de baixa passagem isolado não mostrou a mesma característica. Adicionalmente, os genótipos dos isolados de desafio e de vacina foram (como determinado pelo método de impressão digital) mostrados ser diferentes.

[00079] Múltiplos parâmetros foram investigados durante este estudo para avaliar benefícios da vacina. Daqueles parâmetros, taxas de remoção dos animais e sintomas clínicos articulares foram usados como indicadores primários de proteção articular. A patologia pulmonar (percentual de lesões pulmonares grossas) foi usada como indicador primário da proteção pulmonar. Outros dados, tais como a detecção do organismo a partir do tecido, distribuição articular e sorologia forneceram dados adicionais de confirmação, como fez a soroconversão para *M. bovis* após vacinação.

[00080] Todos os grupos mostraram redução de doença pulmonar e benefícios protetores articulares após receber o candidato de vacina da Vacina de *Mycoplasma bovis* Vivo I (05-2823 P106) apesar da via ou combinação das vias como demonstrado por uma redução de lesões pulmonares, sintomas clínicos articulares e taxas de remoção de animais. A via combinada SQ e IN (Grupo 1) resultou na maior redução das lesões pulmonares (86%) comparada com os grupos que usam somente uma via única. Adicionalmente, os resultados das lesões de pulmão, sintomas clínicos articulares e reduções da taxa de remoção confirmam o benefício de receber dois outros candidatos de vacina da Vacina Viva II (05-249 P102) e Vacina Viva III (05-1902-1 P106) por uma via combinada SQ e IN. Resultados de ELISA demonstraram uma forte resposta humoral à vacinação com todos os candidatos de vacina confirmando que o início da imunidade após uma vacinação única é tão logo 14 dias e que a duração da imunidade é pelo menos 41 dias (ver figura 5).

[00081] Todos os candidatos de vacina demonstraram segurança. Nenhum animal de qualquer grupo recebendo uma vacina apresentou sintomas clínicos durante o período de vacinação e somente um animal que recebeu a Vacina Viva III (05-1902-1 P106) mostrou reatividade em um sítio de injeção e aquela reatividade foi insignificante.

Adicionalmente, os resultados de PCR mostraram detecção de *M. bovis* não desafio a partir de tecido de amígdala de grupos recebendo somente um candidato de vacina através da via IN e detecção não desafio a partir do tecido pulmonar somente em um único animal que recebeu Vacina Viva I (05-2823 P106) por ambas as vias SQ e IN.

[00082] Os dados apoiam a conclusão que, em geral, as vacinas de *M. bovis* vivas novas, atenuadas feitas conforme a presente invenção e fornecidas por várias vias da administração são seguras e eficazes, rápidas no início e longa duração na proteção como composições imunológicas para vacinação de bezerros para prevenir e reduzir várias manifestações de doença causadas pela infecção com *M. bovis* virulento de tipo selvagem.

Exemplo 3

[00083] Este exemplo descreve o processo de impressão digital de DNA usado para diferenciar cepas de *M. bovis* pelo isolamento, amplificação e detecção de DNA usando o método e iniciadores como descrito em WO 2008-030619

Materiais e Métodos

[00084] Isolados de *Mycoplasma sp.* foram usados nos estudos. Isolados foram obtidos de fontes internas ou isolados do campo obtidos a partir de animais infectados. Os isolados foram cultivados usando uma combinação de ágar seletivo e caldo para Micoplasma por 1 a 7 dias. Para isolar DNA, as culturas de caldo foram giradas e precipitadas. DNA a partir do precipitado então foi extraído (usando o Kit de Tecido Qiagen DNeasy e ressuspenso em água de grau molecular). DNA genômico foi quantificado usando Picogreen (Invitrogen). Iniciadores foram desenhados com base nas sequências de inserção conhecidas (elementos transponíveis) presentes no genoma bacteriano (*Mycoplasma bovis*) e são descritos em WO 2008-030619. Iniciadores externamente opostos foram manualmente selecionados a partir das

extremidades de elemento (excluindo as regiões de repetição terminal) em uma T_m de 55 a 58C. As reações de PCR então foram realizadas usando um master mix de PCR multiplex (Conjunto Qiagen Multiplex PCR). As reações continham Master mix 1x, 300nM de cada iniciador e 1 ng de molde de DNA. As condições de ciclagem térmica foram 95C por 15 minutos, 35 ciclos a 94C por 30 segundos, 56,1C por 90 segundos, 72C por 2 minutos, com uma extensão final de 72C por 4 minutos e uma manutenção a 4C. Os produtos amplificados foram separados em gel de agarose 4% com brometo de etídeo (Invitrogen E-gel), corridos por 50 minutos à temperatura ambiente e visualizados sob luz UV.

Resultados e Discussão

[00085] Os resultados mostraram que cada um dos isolados usados neste pedido de patente teve uma impressão digital única. Entretanto, como mostrado no Exemplo 2, cada isolado foi também uma vacina de cultura viva atenuada eficaz que foi eficaz no fornecimento de proteção cruzada contra um desafio isolado tendo uma impressão digital diferente do que qualquer um dos candidatos de vacina. Três isolados de campo, 05-2823 P106 (PTA-8694), 05-249 P102 (PTA-8696), e 05-1902-1-P106 (PTA-8695), foram cultivados e DNA isolado de acordo com o protocolo acima. 2 a 5ng de DNA de cada isolado foram amplificados de acordo com o protocolo acima usando um multiplex de 4 conjuntos de iniciadores de IS identificados como SEQ ID N^{os}. 1 a 8 como descritos em WO 2008-030619. Os produtos amplificados foram separados em um gel de agarose 4% E-gel Invitrogen contendo brometo de etídeo (de acordo com o fabricante) por 50 minutos e visualizados sob luz UV. Todos os isolados produziram padrões únicos. Os padrões foram reprodutíveis usando alíquotas independentes sob condições de reação de PCR da amostra.

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina, caracterizada pelo fato de que compreende uma cepa de bactéria *Mycoplasma bovis* avirulenta atenuada em que a cepa de *Mycoplasma bovis* avirulenta atenuada é selecionada a partir do grupo que consiste nas cepas de bactéria *Mycoplasma bovis* atenuadas depositadas no ATCC sob os números de acesso PTA-8694, PTA 8695 ou PTA 8696.

2. Vacina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a composição imunogênica compreende pelo menos 10E3 CFU das bactérias vivas da bactéria *Mycoplasma bovis* atenuada avirulenta por dose.

3. Vacina de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que a composição imunogênica compreende 10E6 a 10E10 CFU de bactérias vivas da bactéria *Mycoplasma bovis* atenuada avirulenta por dose.

4. Vacina de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que uma dose da composição imunogênica é formulada em 1 ou 2 ml.

5. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que a composição imunogênica é eficaz na estimulação do início da imunidade em 14 dias após a administração de uma dose única.

6. Vacina, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a composição imunogênica é eficaz na estimulação da duração da imunidade de pelo menos 42 dias após a administração de uma dose única da composição imunogênica.

7. Método de atenuação de *M. bovis*, caracterizado pelo fato de que compreende:

- a. passagem das bactérias *M. bovis* por mais de 10 vezes;
- b. obtenção das bactérias *M. bovis* cultivadas;

c. testar as bactérias *M. bovis* cultivadas obtidas sob a etapa b) para sua patogenicidade e imunogenicidade;

d. propagação das bactérias *M. bovis* não-patogênicas, mas imunogênicas para obter as bactérias *M. bovis* atenuadas.

8. Método de produção de uma vacina como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que compreende uma mistura de bactérias de uma cepa de *M. bovis* atenuada, avirulenta, com um veículo farmacêutico aceitável.

9. Uso de cepas de bactéria *Mycoplasma bovis* atenuadas depositadas no ATCC sob os números de acesso PTA-8694, PTA 8695 ou PTA 8696, caracterizado pelo fato de ser para a preparação de uma vacina para o tratamento ou profilaxia de infecções causadas por *M. bovis* ou para a redução da severidade ou incidência de sinais clínicos causados pela *M. bovis*.

FIG. 1

Frequência de Recuperação de Cultura a partir de Amostras Nasais, de Amígdala e de Pulmão
(Dias 0, 14, 28, 35 e Pós)

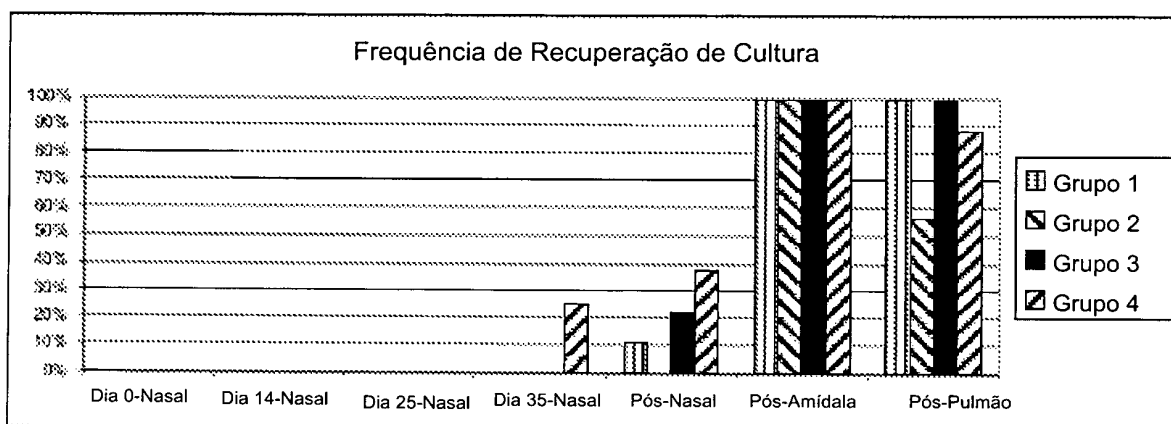
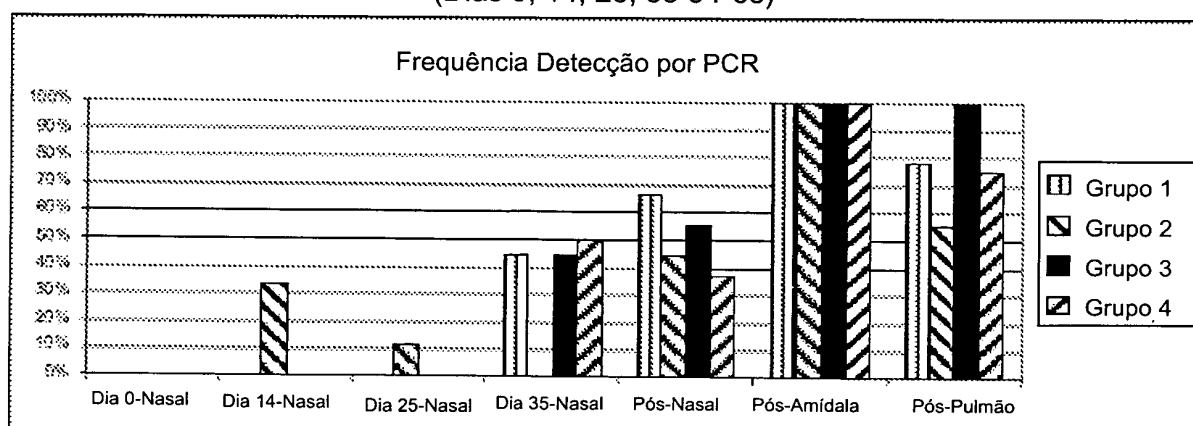


FIG. 2

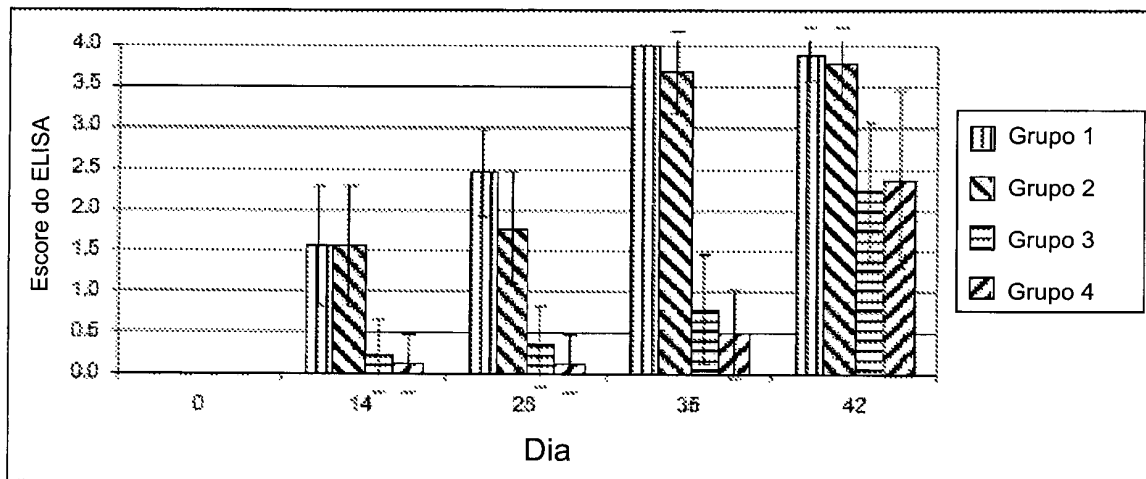
Frequência de Detecção por PCR a partir de Amostras Nasais, de Amígdala e de Pulmão
(Dias 0, 14, 28, 35 e Pós)



Grupo 1=Vacina/Alto Desafio Respiratório; 2=Vacina/Baixo Desafio Respiratório; 3=Sem Vacina/Alto Desafio Respiratório; 4=Sem Vacina/Baixo Desafio

FIG. 3

Escore de Grupo Médio para Anticorpos específicos para *M. bovis* a partir de Amostras de Soro
(Dias 0, 14, 28, 35 e 42)



Grupo 1=Vacina/Alto Desafio Respiratório; 2=Vacina/Baixo Desafio Respiratório; 3=Sem Vacina/Alto Desafio Respiratório; 4=Sem Vacina/Baixo Desafio

FIG. 4

Comparação de Sorologia para Grupo Vac Viva I, II, III e sem Vacina (SC+IN somente)

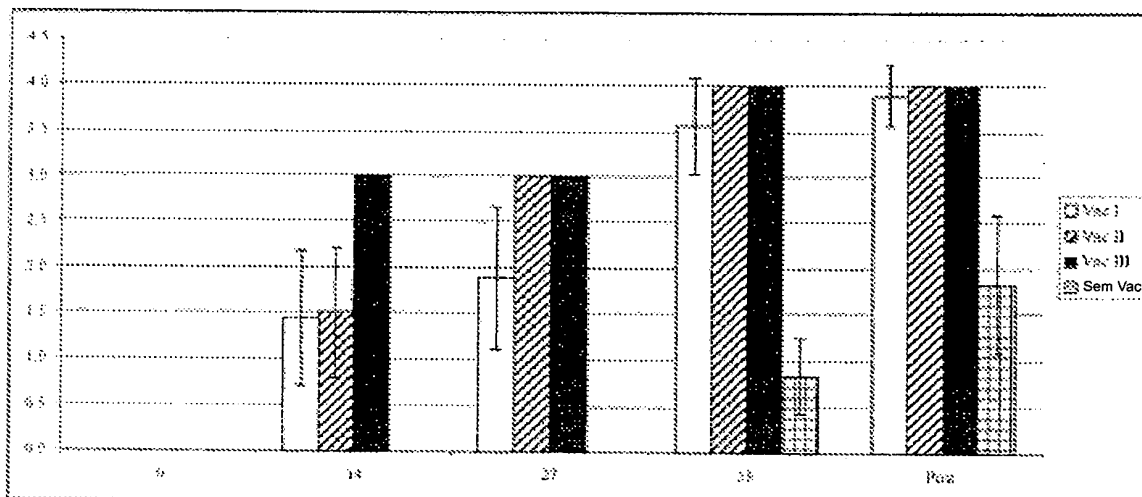


FIG. 5

Comparação de Sorologia para Vac Viva I usando Várias Vias de Administração

