



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

(11) PI 0412911-3 B1



(22) Data do Depósito: 15/07/2004

(45) Data de Concessão: 21/01/2020

(54) Título: "VACINA PARA IMUNIZAÇÃO DE UM ANIMAL E SEU MÉTODO DE FABRICAÇÃO, MÉTODO DE CULTIVO DE LAWSONIA INTRACELLULARIS, MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO DE ENTEROPATIA PROLIFERATIVA EM PORCOS"

(51) Int.Cl.: A61K 39/02; C12N 1/20.

(30) Prioridade Unionista: 25/07/2003 US 60/490,001.

(73) Titular(es): BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA, INC..

(72) Inventor(es): MICHAEL B. ROOF; JEREMY J. KROLL; JEFFREY P. KNITTEL.

(86) Pedido PCT: PCT US2004022704 de 15/07/2004

(87) Publicação PCT: WO 2005/011731 de 10/02/2005

(85) Data do Início da Fase Nacional: 25/01/2006

(57) Resumo: "LAWSONIA INTRACELLULARIS DE ORIGEM EUROPÉIA E VACINAS, AGENTES DE DIAGNÓSTICO E MÉTODOS DE USO DA MESMA". A presente invenção refere-se a vacinas de *L. intracellularis*, e a métodos de proteção contra e diagnóstico de infecção de *L. intracellularis*. Os produtos e processos da invenção são alcançados, em parte, como resultado de um aperfeiçoado método de cultura em grande escala de *L. intracellularis*, incluindo um novo isolado de *L. intracellularis* de origem Européia e um método de preparação de um produto liofilizado contendo o isolado Europeu atenuado como um produto de vacina.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"VACINA PARA IMUNIZAÇÃO DE UM ANIMAL E SEU MÉTODO DE FABRICAÇÃO, MÉTODO DE CULTIVO DE *LAWSONIA INTRACELLULARIS*, MÉTODO PARA O DIAGNÓSTICO DE ENTEROPATIA PROLIFERATIVA EM PORCOS"**.

5 Pedido de Patente Correlacionado

O presente Pedido de Patente reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U.S. Nº de Série 60/490.001, depositado em 25 de julho de 2003, cuja descrição é aqui incorporada integralmente por essa referência.

Antecedentes da Invenção

10 A presente invenção refere-se a vacinas de *Lawsonia intracellularis* e a métodos para proteção e diagnóstico de infecção de *L. intracellularis*. Os produtos e processos da invenção podem ser obtidos, em parte, como resultado de um aperfeiçoado método de cultura em grande escala de suprimentos de *L. intracellularis*, incluindo um novo organismo de *L. intracellularis* de origem Européia e um método de preparação de produto liofilizado
15 contendo o organismo Europeu atenuado como produto de vacina.

A *L. intracellularis*, o agente que provoca a enteropatia proliferativa suína ("PPE"), afeta virtualmente todos os animais, incluindo: coelhos, furões, cricetos, raposa, cavalos e outros animais diferentes, como avestruzes e emas. A *L. intracellularis* é uma causa de perda particularmente grande nos rebanhos de suínos da Europa, assim como, nos Estados Unidos.

Uma característica consistente da PPE é a ocorrência de bacilos curvos aglutinados em membrana, intracitoplásmicos, dentro de enterócitos em porções afetadas do intestino. As bactérias associadas à PPE foram referidas como "organismos tipo *Campilobacter*" (S.McOrist e outros, Vet. Pathol., Volume 26, 260-264 (1989). Subseqüentemente, a bactéria causadora
25 foi identificada como um novo gênero e espécie taxonômica, vernacularmente referida como *Ileal symbiont intracellularis*, (C. Gebhart e outros, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Volume 43, Nº 3, 533-538 (1993). Mais recentemente, essa nova bactéria recebeu o nome taxonômico de *Lawsonia (L.) intracellularis* S. McOrist e outros, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Volume
30 43, Nº 4, 820-825 (1995). Esses nomes têm sido usados permutavelmente

para se referir ao mesmo organismo, conforme adiante identificado e aqui descrito.

A *L. intracellularis* é uma bactéria intracelular, obrigatória, que não pode ser cultivada por métodos bacteriológicos normais em meios convencionais isentos de célula e foi imaginada necessitar de células epiteliais fixadas para crescimento. S. McOrist e outros, *Infection and Immunity*, Volume 61, Nº 19, 4286-4292 (1993), e G. Lawson e outros, *J. of Clinical Microbiology*, Volume 31, Nº 5, 1136-1142 (1993) discutem a cultura de *L. intracellularis* usando monocamadas de células epiteliais intestinais de rato IEC-18 em frascos de cultura de tecido convencional. Além disso, H. Stills, *Infection and Immunity*, Volume 59, Nº 9, 3227-3236 (1991) discute o uso de monocamadas de célula intestinal embrionária humana Intestine 407 e de monocamadas de célula de adenocarcinoma colônica de cobaia GPC-16 em frascos de cultura de tecido convencionais.

Recentemente, uma vacina de *L. intracellularis* foi aprovada para uso nos Estados Unidos, cuja vacina é baseada em isolados de *L. intracellularis*, descritos e reivindicados nas Patentes U.S. Nºs 5.714.375, 5.885.823, ambas as patentes sendo aqui integralmente incorporadas por meio dessas referências. A vacina acima descrita é vendida pela Boehringer Ingelheim Vetmedica Inc., 2621, North Belt Highway, St. Joseph, Missouri, 64506-2002, sob a marca comercial ENTERISOL® Ileitis.

Sumário da Invenção

Um objetivo da invenção é proporcionar uma aperfeiçoada vacina de *L. intracellularis*, usando um isolado de origem Européia.

Outro objetivo da invenção é proporcionar um aperfeiçoado método para cultura da *L. intracellularis* em larga escala e aperfeiçoadas técnicas de produção de vacinas de *L. intracellularis*.

Para obtenção desses e outros objetivos, e em conformidade com a finalidade da invenção, conforme apresentado e amplamente aqui descrito, a presente invenção proporciona um novo isolado de *L. intracellularis* da Europa, um método de atenuar tal organismo e o organismo atenuado do mesmo. Também se proporciona uma vacina compreendendo o organis-



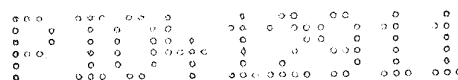
mo atenuado. Também aqui se proporciona um método para produção de uma vacina que compreende o isolado atenuado em uma forma liofilizada, para reconstituição do momento da administração e o produto liofilizado do mesmo.

- 5 Em uma modalidade, o novo isolado *L. intracellularis* da Europa, o isolado DK 15540, se encontra depositado como isolado com protocolo de acesso ATCC Nº PTA-4927. Em outra modalidade, o isolado atenuado, derivado do isolado DK 15540 é designado como isolado B3903, protocolo de acesso ATCC Nº PTA-4926.

10 Descrição Detalhada

- Conforme aqui usado, o termo "*L. intracellularis*" significa a bactéria gram-negativa curva, intracelular, descrita em maiores detalhes por C. Gebhart e outros, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Volume 43, Nº 3, 533-538 (1993) e por S. McOrist e outros, Int'l. J. of Systemic Bacteriology, Volume 45, Nº 4, 820-825 (1995), cada uma dessas referências sendo aqui integralmente incorporada e incluindo, mas sem ser limitado, o isolado DK 15540, o qual foi depositado sob as condições do Tratado de Budapeste no American Type Culture Collection, 10801, University Boulevard, Manassas, Virgínia, 20110-2209, em 9 de janeiro de 2003 e foi atribuído pelo ATCC o número de acesso PTA-4927; a bactéria causadora que pode ser obtida de suínos ou outros animais infectados com a PPE em todo o mundo, de acordo com o conhecimento do estado da técnica e com os presentes ensinamentos aqui descritos; e variantes ou mutantes da bactéria acima, caso espontânea ou artificialmente obtida.

- 25 Conforme aqui usado, o termo "isolado atenuado" significa qualquer isolado de *L. intracellularis*, que é preparado de acordo com técnicas de cultura e de passagem aqui ensinadas, para obtenção de avirulência, ao mesmo tempo em que se mantém as propriedades imunogênicas, quando administrado a um animal hospedeiro, incluindo, mas sem ser limitado, o isolado atenuado designado por B-3903, o qual foi depositado sob as condições do Tratado de Budapeste no American Type Culture Collection, 10801, University Boulevard, Manassas, Virgínia, 20110-2209, em 9 de janeiro de



2003 e foi atribuído pelo ATCC o número de acesso PTA-4926.

O isolado atenuado da invenção pode ser usado como um imunógeno em vacinas antimicrobianas para animais, incluindo, pássaros, peixe, e mamíferos, tais como, gado, suínos, cavalos e primatas. Tais vacinas podem ser preparadas por meio de técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica e pelos ensinamentos aqui apresentados. Tal vacina pode compreender uma quantidade imunologicamente eficaz do isolado atenuado em um veículo farmacêuticamente aceitável. A vacina pode ser administrada em uma ou mais doses. Uma quantidade imunologicamente eficaz é determinada por meios conhecidos na técnica sem a indevida experimentação dada nos ensinamentos aqui contidos. A quantidade de bactéria avirulenta deve ser suficiente para estimular uma resposta imune em animais suscetíveis a doenças, enquanto ainda avirulentos. Isto irá depender dos específicos animal, bactéria e doença envolvidos. A dose recomendada a ser administrada ao animal suscetível é preferencialmente cerca de 3,0 TCID₅₀ (ponto terminal de 50% de dose infecciosa de cultura de tecido)/dose a cerca de 6,0 TCID₅₀/dose e, mais preferencialmente, cerca de 4,0 TCID₅₀/dose a 5,0 TCID₅₀/dose. Em uma modalidade preferida, a titulação da vacina é de cerca de 4,9 TCID₅₀/dose, conforme determinado pelo ensaio de diluição do ponto terminal de 50% de Dose Infecciosa de Cultura de Tecido (TCID₅₀). Os veículos são conhecidos por aqueles versados na técnica e incluem estabilizantes e diluentes. Essa vacina pode também conter um apropriado adjuvante. As vacinas da invenção podem ser usadas em combinação com outras vacinas, por exemplo, como um diluente de outra vacina. As preparações de vacina podem também ser dissecadas, por exemplo, através de secagem por congelamento, para fins de armazenamento ou para subsequente formulação em vacinas líquidas.

Conseqüentemente, a invenção também compreende um método para induzir uma resposta imune à bactéria virulenta *L. intracellularis* do tipo selvagem, em um animal hospedeiro, para fins de proteção do hospedeiro de tal bactéria. O método compreende a administração de uma quantidade imunologicamente eficaz da bactéria atenuada ou bactéria morta, de a-



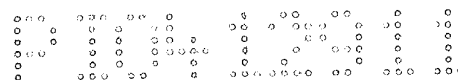
cordo com a invenção, ao hospedeiro e, preferencialmente, administração da vacina da invenção ao hospedeiro.

Conforme aqui usado, o termo "cultura em larga escala" significa um nível de cultura de *L. intracellularis* maior que aproximadamente 2,0 a 3,0 litros e inclui a produção de uma escala de 100 litros ou mais. "Cultura", conforme aqui usado, significa o processo de promover o crescimento, reprodução e/ou proliferação da *L. intracellularis*.

A *L. intracellularis* pode ser cultivada através de métodos conhecidos na técnica, preferencialmente, de acordo com o descrito nas Patentes U.S. Nºs 5.714.375 e 5.885.823. Por exemplo, a cultura das células pode primeiro ser inoculada com um inóculo compreendendo a bactéria de *L. intracellularis*, de modo a infectar as células com a bactéria. Numerosas linhas celulares podem ser usadas na prática da presente invenção, incluindo, mas sem ser limitado, células epiteliais intestinais de rato, IEC-18 (ATCC 1589), células de carcinoma epidermóide humano, HEp-2 (ATCC 23), células de camundongo (não especificadas), McCoy's (ATCC 1696), células verdes de rim de macaco e búfalo, BGMK (Biowhittaker #71-176) e células do epitélio intestinal de suínos. As células para cultura preferidas são as células HEp-2, McCoy's ou IEC-18.

Se forem usadas células para cultura antes de serem inoculadas, as células podem se apresentar na forma de uma monocamada. Para formar uma monocamada, as células podem ser semeadas em frascos convencionais. Cada frasco é geralmente semeado com uma quantidade entre cerca de 1×10^5 células a cerca de 10×10^5 células por frasco ou rolo de 25, 75, 150, 850 cm^2 , misturado com o meio de crescimento. O meio de crescimento pode ser qualquer meio para cultura de células, incluindo uma fonte de nitrogênio, necessários fatores de crescimento para as células escolhidas para cultura e uma fonte de carbono, tal como, glicose ou lactose. O meio preferido é DMEM fortificado com F12 de Ham, com 1-5% de soro fetal bovino, embora outros meios comercialmente disponíveis possam ser usados com satisfatórios resultados.

Uma cultura bem sucedida de *L. intracellularis* é destacada pela

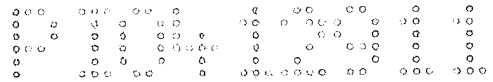


manutenção das células de cultura em um constante estado de crescimento. Portanto, a monocamada de célula de cultura deve ser de cerca de 20% a cerca de 50% de confluência no momento da inoculação. Preferencialmente, as células devem ser de cerca de 30% a cerca de 40% de confluência no momento da inoculação, mais preferencialmente, de cerca de 30% de confluência.

Alternativamente, as células antes de serem inoculadas podem ser cultivadas em suspensão, conforme descrito adiante. Preferencialmente, as células são primeiro cultivadas com confluência de 100%, na forma de uma monocamada em um sistema do tipo aderente, por exemplo, um sistema de garrafa cilíndrica e depois transferidas para 3-3000 litros e cultivadas em suspensão. Alternativamente, as células podem ser cultivadas em suspensão na desejada densidade de célula, por exemplo, 2×10^5 células/ml, dentro do vaso de 3-3000 litros (biorreator Fermentor, frasco giratório, etc.), usando parâmetros adequados para a cultura, dentro desse sistema, antes da inoculação.

A inoculação pode ser uma cultura pura de *L. intracellularis*, obtida de suínos ou outros animais infectados. Preferencialmente, o inóculo pode ser uma cultura pura de *L. intracellularis*, obtida do ATCC, Nº de Acesso PTA-4927.

O inóculo pode ser um homogeneizado intestinal, preparado mediante raspagem da mucosa do íleo de um suíno ou outro animal infectado com PPE. Quando da preparação de um homogeneizado intestinal, as seções do ílio selecionadas para cultura devem mostrar lesões graves, com grosso espessamento do intestino. Devido à natureza frágil da bactéria, as amostras devem, preferencialmente, ser armazenadas à temperatura de -70°C , o mais rápido possível depois da necropsia. Um antibiótico ao qual a *L. intracellularis* é resistente, tal como, Vancomicina, Anfotericina ou membros do grupo aminoglicosídeo de antibióticos, incluindo Gentamicina e Neomicina, apenas para citar alguns, é preferencialmente adicionado ao inóculo para suprimir a bactéria contaminante, ao mesmo tempo permitindo o crescimento da *L. intracellularis*. Se o inóculo for uma cultura pura ou um



homogeneizado intestinal, a inoculação pode ser realizada por meio de diversos procedimentos conhecidos na técnica e de acordo com os presentes ensinamentos.

13

5 A bactéria e/ou células de cultura inoculada são depois incubadas sob uma reduzida concentração de O_2 dissolvido. Em concentrações de oxigênio dissolvido maiores que 10%, o crescimento de *L. intracellularis* é menor que o ótimo, com a interrupção do crescimento que eventualmente ocorre em concentrações de oxigênio fora dessa faixa. Preferencialmente, a bactéria e/ou células de cultura inoculada são incubadas em uma concentra-

10 ção de oxigênio dissolvido na faixa de cerca de 0% a cerca de 10%. Mais preferencialmente, a bactéria e/ou as células são incubadas em uma concentração de oxigênio na faixa de cerca de 0% a cerca de 8%, com uma concentração de oxigênio de cerca de 0% a cerca de 3% sendo mais preferida.

15 A adequada concentração de dióxido de carbono é também importante para o apropriado crescimento ou cultura da *L. intracellularis*. Em concentrações de dióxido de carbono maiores que 0% e inferiores a 4%, ocorre um crescimento não-ótimo, com interrupção do crescimento eventualmente ocorrendo em concentrações de dióxido de carbono fora dessa faixa.

20 Preferencialmente, a concentração de dióxido de carbono se situa na faixa de cerca de 6% a cerca de 10%, com uma concentração de dióxido de carbono de cerca de 8,8% sendo mais preferida.

Além disso, as células são preferencialmente incubadas em uma concentração de hidrogênio na faixa de cerca de 4% a cerca de 10%. Mais

25 preferencialmente, as células são incubadas em cerca de 0 a cerca de 8,0% de O_2 , cerca de 8,8% de CO_2 e cerca de 4% de H_2 . O nitrogênio é usado como um "balanço" na mistura de gás contendo nitrogênio (96%) e hidrogênio (4%) ou nitrogênio (80%), dióxido de carbono (10%) e hidrogênio (10%) para crescimento do organismo. As células são preferencialmente incubadas

30 em uma concentração de nitrogênio na faixa de cerca de 80% a 96%. Portanto, as células são mais preferencialmente incubadas em cerca de 0 a cerca de 8,0% de O_2 , cerca de 8,8% de CO_2 , cerca de 4% de H_2 e cerca de

96% de N₂.

As células podem ser incubadas em uma incubadora de gás duplo ou outras câmaras de gás que contêm as concentrações adequadas de hidrogênio, oxigênio e dióxido de carbono e que permitem às células serem suspensas durante a incubação. A câmara deve compreender um dispositivo para manter as células inoculadas em suspensão e manter as adequadas concentrações de gás. A temperatura de incubação deve ser na faixa de 30°C a cerca de 45°C, mais preferencialmente, na faixa de cerca de 36°C a cerca de 38°C. Mais preferencialmente, a temperatura é de cerca de 37°C. O equipamento necessário para a cultura e atenuação é prontamente disponível para aqueles versados na técnica e conforme os ensinamentos aqui apresentados. Um exemplo de um adequado equipamento para realização da presente invenção é uma incubadora de gás duplo, por exemplo, modelo 480 (Lab-Line, Melrose Park, IL), em conjunto com frascos giratórios para manter as células em suspensão. O equipamento presentemente preferido compreende um dispositivo fermentador, um biorreator, uma placa de agitação ou agitador rotativo, contendo pelo menos 2 litros de um meio e capaz de manter as células de cultura em suspensão através de gás de dispersão de concentração adequada ou de outros meios de agitação mecânica e continuamente monitorando os níveis dissolvidos de O₂ no meio. As Empresas New Brunswick, Braun e outras empresas fabricam adequados dispositivos fermentadores e biorreatores para tal finalidade.

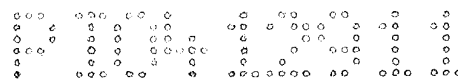
Ao manter as células inoculadas em estado suspenso durante a incubação, se obtém um máximo crescimento das células e, em consequência, da *L. intracellularis*, mediante aumento de cada exposição de célula individual ao meio de crescimento e da apropriada mistura de hidrogênio, oxigênio e dióxido de carbono. As células de cultura podem ser agitadas e mantidas em suspensão por meio de uma variedade de métodos conhecidos na técnica, incluindo, por exemplo, frascos de cultura, garrafas cilíndricas, culturas de membrana, biossacos, sistemas de biorreator WAVE®, dispositivos fermentadores e frascos giratórios. As células podem ser mantidas em suspensão durante a incubação, através da incubação das células em um fras-

co giratório dentro de uma incubadora de gás duplo ou dispositivo similar. O termo "frasco giratório", conforme aqui usado, significa um frasco ou outro recipiente que emprega uma palheta, hélice ou outro meio para agitar a cultura e manter as células ali contidas em suspensão.

5 Em uma modalidade preferida, as células inoculadas são incubadas até as células obterem confluência e depois as células são colocadas em um frasco giratório contendo meio de crescimento e incubadas em uma incubadora de gás duplo, durante o giro do frasco. Preferencialmente, as células inoculadas são raspadas ou tripsinizadas e passadas no frasco giratório. Isso pode ser obtido através de uma variedade de métodos conhecidos na técnica, tais como, uso de um dispositivo raspador de células, para destacar as células. Uma vez que as células tenham sido introduzidas dentro do frasco giratório, a palheta do frasco giratório é tipicamente girada na faixa de cerca de 5 a cerca de 500 rpm sobre uma placa de agitação magnética, a fim de manter as células infectadas em suspensão.

15 Uma porção da *L. intracellularis* cultivada é depois transferida para uma cultura fresca, para aumentar a produção da bactéria de *L. intracellularis*. O termo "passagem para" ou variações do mesmo, significa aqui o processo de transferir uma porção da *L. intracellularis* cultivada para células de cultura frescas, a fim de infectar as células frescas com a bactéria. O termo "fresco", conforme aqui usado, significa células que não foram ainda infectadas pela *L. intracellularis*. Preferencialmente, essas células se encontram na média de aproximadamente, não mais que um dia de idade.

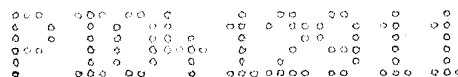
25 A transferência de *L. intracellularis* em culturas em suspensão pode ser conseguida mediante remoção de uma porção da cultura original e adição da mesma para um novo frasco contendo células de cultura frescas. Se a cultura original apresentar um alto número de bactérias/ml, por exemplo, maior que cerca de 10^4 bactérias/ml, é preferível se adicionar entre 1 a 10% (volume por volume) da cultura do frasco infectado para um novo frasco contendo células frescas. Isto é preferencialmente feito quando 50-100% das células são infectadas. Se menos de 50% das células forem infectadas, a transferência é preferencialmente obtida mediante divisão da cultura (1:2)



em um novo frasco e aumentando o volume através da adição de células e meio de cultura de tecido frescos. De qualquer modo, a lise das células e outras etapas não são necessárias, em contraste direto com a transferência de culturas de monocamada, como ocorre no estado da técnica.

5 Após suficiente crescimento das células de cultura e subsequente infecção pela *L. intracellularis*, conforme determinado pelo método de manchamento de anticorpo por fluorescência indireta (IFA), TCID₅₀ ou outro método comparável, pelo menos uma porção da bactéria *L. intracellularis* cultivada é depois colhida. A colheita é tipicamente executada na infeciosidade da célula de cerca de 60% ou superior a isso; entretanto, aqueles versados na técnica sabem que a colheita pode ser executada em uma infeciosidade de célula inferior a 60%. A etapa de colheita pode ser executada mediante separação da bactéria da suspensão através de diversas técnicas conhecidas por aqueles versados na técnica e conforme os ensinamentos aqui apresentados. Preferencialmente, a *L. intracellularis* é colhida mediante centrifugação dos conteúdos de toda ou de uma porção da suspensão, de modo a granular as células de cultura, refazendo a suspensão dos grânulos de célula resultante e lisando as células infectadas. Tipicamente, pelo menos uma porção dos conteúdos é centrifugada em cerca de 3000 xg durante cerca de 20 minutos, a fim de granular as células e bactérias. O grânulo pode ser depois novamente suspenso em, por exemplo, uma solução de sacarose-fosfato-glutamato (SPG) e passados aproximadamente 20 vezes através de uma agulha de calibre 25, a fim de lisar as células. Se for desejada uma posterior purificação, as amostras podem ser centrifugadas em cerca de 145 xg durante cerca de cinco minutos, para remover os núcleos celulares e fragmentos. O sobrenadante pode ser depois centrifugado em cerca de 3000 xg, durante cerca de vinte minutos e o grânulo resultante ser novamente suspenso em um adequado diluente, tal como, soro fetal bovino (SPG) (para tornar a bactéria colhida adequada para liofilização, congelamento ou uso como inoculante), ou meio de crescimento (para tornar a bactéria colhida mais adequada para transferência para as células frescas).

Conforme previamente mencionado, o crescimento eficaz de *L.*



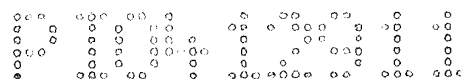
intracellularis para produção em grande escala é intensificado mediante manutenção das células de tecido ativamente crescendo. Com as monocamadas, quando as culturas se tornam confluentes, a velocidade de divisão de célula diminui substancialmente. Tentativas para a cultura de *L. intracellularis* ou culturas de tecido de monocamada têm tido sucesso limitado e um aumento de escala de produção não foi possível. No entanto, o uso de culturas em suspensão facilita acentuadamente a manutenção das células que ativamente crescem e permite uma contínua expansão da cultura e aumento da escala de produção. O uso de um dispositivo fermentador e de uma quantidade entre 0 a 3% de oxigênio dissolvido, conforme explicado acima, possibilita o crescimento de até e superior a 10^8 bactérias/ml.

Quando se utiliza células IEC-18, é preferível se adicionar gelatina, agarose, colágeno, acrilamida ou pérolas de sílica, tais como, microveículos porosos Cultisphere-G (HyClone Laboratories, Logan Utah), junto com o meio de crescimento. Entretanto, as células HEp-2 e outras não precisam de microveículos conforme os métodos aqui usados.

Para fins de manutenção da cultura, com células de cultura HEp-2, preferencialmente, 25% a 50% da cultura é removida e substituída por um meio fresco em intervalos semanais. Para culturas de células com microveículos ou pérolas, preferencialmente, 25% a 50% da cultura é removida e substituída por um meio fresco 1-2 vezes por semana. Para fins de produção em escala, um adicional de 25% a 50% do meio ou meio com microveículos pode ser adicionado à cultura.

Dependendo da velocidade com que as células de cultura se tornam infectadas, a transferência para as células frescas geralmente ocorre entre cada 2 a 7 dias. Supondo que as células de cultura se tornem pelo menos 70% infectadas dentro de 2 a 7 dias, preferencialmente, a transferência ocorre entre aproximadamente cada 5 a 7 dias.

A presente invenção também proporciona vacinas e métodos para produção de vacinas contra o novo isolado de *L. intracellularis* de origem Européia. Preferencialmente, após a manutenção das células infectadas em suspensão por um tempo prolongado (por exemplo, 6 a 8 meses),

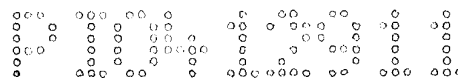


18
pelo menos uma porção da bactéria cultivada de *L. intracellularis* é colhida e monitorada para uma potencial atenuação. Tal monitoramento é preferencialmente conseguido mediante ataques ao animal hospedeiro ou animal modelo, para selecionar um isolado atenuado. Tais isolados atenuados são usados em vacinas, de acordo com os métodos aqui ensinados.

A presente invenção permite rápida expansão da cultura, um aumento de produção de 100-1000 vezes, e um reduzido custo para a produção da *L. intracellularis* de origem Européia. Como resultado, o abundante suprimento de bactéria *L. intracellularis* produzida é facilmente atenuado para fins de produção de vacina. O método de cultura de *L. intracellularis* em suspensão acentuadamente aumenta a facilidade, velocidade e número de bactérias disponíveis para essa finalidade. Quanto maior for o número de células e divisões de células ocorrentes, maior será o nível de mutações ocorrentes, o que é conveniente no desenvolvimento da vacina. Assim, a cultura em suspensão aumenta a expressão de importantes imunógenos controlados por genes ambientalmente regulados e seus produtos de expressão.

Os resultantes isolados atenuados podem ser cultivados em monocamadas de cultura de tecido, mas são preferencialmente cultivados em culturas em suspensão. Outros meios de atenuação podem incluir meios de atenuação química mediante uso, por exemplo, de N-metil nitrosoguani-
dina e outros compostos conhecidos na técnica. Através de múltipla transferência ou mediante um meio químico, é produzida uma *L. intracellularis* atenuada, sendo depois selecionada para preparação de vacina. Em uma modalidade preferida, o resultante isolado atenuado consiste do acesso ATCC, número PTA-4926.

O antígeno da vacina pode ser colhido mediante centrifugação ou microfiltração, conforme descrito acima. O antígeno é depois padronizado em um nível definido, baseado na resposta ótima do animal hospedeiro imune, determinada por uma titulação de dose nas espécies do animal hospedeiro. A bactéria pode ser inativada mediante métodos conhecidos na técnica, por exemplo, mediante uso de 0,3% de formol ou outros agentes de inativação, para preparar uma vacina inativada. O antígeno é depois incorpora-



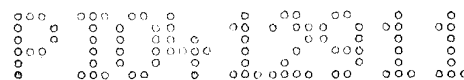
do dentro de um adequado adjuvante, tal como, hidróxido de alumínio ou óleo mineral, para intensificar a resposta imune. O antígeno é depois usado para vacinar o hospedeiro através da administração intramuscular ou subcutânea, no caso de suínos com cerca de 3-4 semanas de idade, com uma dose de reforço, se necessário.

Preferencialmente, a bactéria é serialmente transferida para induzir e selecionar uma cultura viva atenuada e avirulenta. A cultura é testada no animal hospedeiro quanto aos sinais de atenuação. A cultura é colhida, conforme descrito anteriormente, e liofilizada. Os suínos, por exemplo, são oralmente vacinados com 1×10^4 a 1×10^6 bactérias. Cerca de vinte e oito dias após a vacinação, os suínos são oralmente inoculados com cerca de 1×10^7 organismos provenientes de uma transferência inferior (menos de 30 transferências *in vitro*, após o isolamento original do homogeneizado do intestino) da cultura virulenta de *L. intracellularis*. Os animais infectados são necropsiados 21 dias após o ataque e os intestinos delgados são observados quanto às lesões graves, assim como, lesões microscópicas. Procedimentos de PCR, anticorpo fluorescente indireto (IFA) ou imunoistoquímica podem também ser executados.

Cerca de oitenta por cento dos animais de controle irão mostrar lesões graves ou microscópicas e teste positivo quanto à presença de *L. intracellularis* nas células da mucosa dos intestinos, usando os métodos de teste de PCR, IFA ou IHC. Os animais vacinados irão ter superfícies de mucosa normais, conforme determinado por observações histológicas e serão negativos quanto ao teste PCR 3 a 4 dias após a inoculação.

Geralmente, um isolado atenuado, imunogênico de *L. intracellularis*, é produzido após uma contínua cultura durante cerca de 150 a cerca de 250 dias, durante cujo tempo a cultura é transferida cerca de 50-100 vezes. Entretanto, alguém versado na técnica sabe que outras culturas atenuadas podem ser produzidas ao se variar esses números.

O produto de vacina da invenção pode ser liofilizado. Após a colheita, o isolado pode ser concentrado através de diversos métodos conhecidos na técnica e pode ser misturado com um estabilizador, por exemplo, um



estabilizador de gelatina de sacarose. O produto de vacina pode depois ser submetido ao congelamento e secagem (liofilização). Geralmente, a etapa de congelamento compreende pular para a temperatura de $-45^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, com manutenção dessa temperatura durante cerca de 150 a cerca de 480 minutos. A etapa de secagem pode compreender etapas de secagem primária e secundária. Por exemplo, a etapa de secagem primária pode compreender: (a) pular para uma temperatura entre cerca de -30°C a cerca de -5°C , mantendo esta entre cerca de 120 minutos a cerca de 1000 minutos e, opcionalmente (b) pular para uma temperatura entre cerca de -5°C a cerca de 5°C , mantendo esta entre cerca de 150 a cerca de 2000 minutos. A etapa secundária geralmente compreende pular para a temperatura de cerca de $27^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ com manutenção desta entre cerca de 330 a cerca de 1120 minutos. Alguém versado na técnica sabe que essas faixas de temperatura podem ser ajustadas dependendo das condições, por exemplo, do volume de partida.

Uma vacina é então preparada, compreendendo uma quantidade imunologicamente eficaz da *L. intracellularis* atenuada em um veículo farmacêuticamente aceitável. Em uma modalidade preferida, a vacina compreende o acesso de ATCC Nº PTA-4926, em um veículo farmacêuticamente aceitável. A mistura do imunógeno e veículo podem estar na forma de uma solução aquosa, emulsão ou suspensão. Uma quantidade imunologicamente eficaz pode ser determinada por um meio conhecido na técnica, sem a indevida experimentação dada nos ensinamentos aqui contidos. Em geral, a quantidade de imunógeno será entre 5 e 5000 microgramas e entre $10^{2,0}$ e $10^{9,0}$ TCID₅₀, preferencialmente, entre $10^{3,0}$ e $10^{6,0}$ TCID₅₀, mais preferencialmente, entre $10^{4,0}$ e $10^{5,0}$ TCID₅₀, quando são usadas bactérias purificadas.

A presente invenção também compreende mistura de vacinas compreendendo o atenuado isolado de *L. intracellularis*, designado pelo acesso ATCC Nº PTA-4296 e material antigênico de pelo menos um outro patógeno, incluindo, mas sem ser limitado: *Salmonella* spp. (por exemplo, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella typhimurium*), *Erysipelothrix* spp. (por exemplo, *Erysipelothrix rhusiopathiae*), *Haemophilus* spp. (por exemplo, *Ha-*

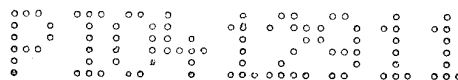


emophilus parasuis), Mycolasma spp. (por exemplo, Mycoplasma hyopneumonia), Leptospira spp., Clostridium spp. (por exemplo, Clostridium perfringens, Clostridium difficile), Streptococcus spp. (por exemplo, Streptococcus suis), Brachyspira hyodysenteriae), Bordetella (por exemplo, Bordetella bronchiseptica), Pasteurella spp. (por exemplo, Pasteurella multocida), circovirus (por exemplo, circovirus tipo 2 de porco), vírus da síndrome reprodutora e respiratória de porco (PRRS), vírus da gripe suína (SIV), coronavírus (por exemplo, vírus da gastroenterite transmissível (TGE), vírus da coroa respiratória de porco, parvovirus ou Escherichia coli; e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Em uma modalidade, a mistura de vacina compreende o atenuado isolado de *L. intracellularis*, designado pelo acesso ATCC Nº PTA 4926 e material antigênico de *Salmonella cholerasuis*, *Erysipelothrix* spp., *Clostridium* spp., *Brachyspira* spp., vírus da gastroenterite transmissível (TGE) e *Escherichia coli*; e um veículo farmacêuticamente aceitável. O material antigênico de *Clostridium* spp. pode incluir, mas sem ser limitado, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile*. O material antigênico de *Erysipelothrix* pode incluir, mas sem ser limitado, *Erysipelothrix rhusiopathiae*.

Em outra modalidade, a mistura de vacina compreende o atenuado isolado de *L. intracellularis*, designado pelo acesso ATCC Nº PTA 4926 e material antigênico de *Salmonella cholerasuis* e *Erysipelothrix* spp.; e um veículo farmacêuticamente aceitável. Em outra modalidade, a mistura de vacina compreende o isolado atenuado de *L. intracellularis*, designado pelo acesso ATCC Nº PTA 4926 e material antigênico de *Salmonella cholerasuis* e *Erysipelothrix rhusiopathiae*; e um veículo farmacêuticamente aceitável.

Em outra modalidade, a mistura de vacina compreende o atenuado isolado de *L. intracellularis*, designado pelo acesso ATCC Nº PTA 4926 e material antigênico de pelo menos um outro patógeno, incluindo, mas não limitando: *Clostridium* spp. (por exemplo, *Clostridium tetani*), vírus da gripe eqüina (EIV) (por exemplo, EIV-1, EIV-2), vírus da herpes eqüina (EHV) (por exemplo, EHV-1, EHV-2, EHV-3, EHV-4, EHV-5, EHV-6, EHV-7), alfavírus (por exemplo, vírus da encefalite oriental, vírus da encefalite ocidental, vírus



da encefalite Venezuelana) ou vírus de West Nile; e um veículo farmacêuticamente aceitável.

As vacinas de acordo com a invenção são, geralmente, administradas a animais sensíveis, preferencialmente, suínos, em uma ou mais doses. A vacina ativada ou inativada pode ser administrada 1 ou 2 vezes, em intervalos de 2 semanas. Para as vacinas atenuadas ativas, é preferida uma dose. As rotas preferidas de administração dos isolados atenuados são a rota intramuscular, oral ou intranasal, mas, as rotas intramuscular e subcutânea são as mais preferidas para a vacina inativada.

O diagnóstico eficaz da PPE tem também sido impedido pelo tempo requerido para a cultura da bactéria causadora. Como resultado da presente invenção, é agora possível o desenvolvimento de ferramentas de diagnóstico que promovem rápidos e precisos ensaios quanto à presença de *L. intracellularis* em amostras biológicas tomadas de suínos e outros animais sensíveis à PPE.

A bactéria de *L. intracellularis* de origem Européia da presente invenção, ou componentes derivados de tal bactéria, podem ser usados como um antígeno em um imunoensaio ELISA ou outro imunoensaio, tal como, o teste do anticorpo imunofluorescente ("IFA"), para detectar anticorpos para a *L. intracellularis*, no soro e outros fluidos do corpo de animais suspeitos de estarem infectados com a bactéria. O imunoensaio presentemente preferido é um ensaio IFA, conforme descrito no Exemplo abaixo. Alternativamente, a bactéria da presente invenção pode ser usada em um ensaio de Western Blot.

O protocolo do ensaio ELISA de acordo com a invenção é como segue:

1. Adicionar 0,1 mL/cavidade de antígeno diluído em um tampão de revestimento. Incubar por 18 horas à temperatura de 4°C.

2. Lavar 3 vezes com PBS.

3. Adicionar 0,25 ml de tampão de bloqueio a cada cavidade da placa. Incubar de 1 a 2 horas a 37°C.

4. Lavar 3 vezes com tampão de lavagem.



5. Diluir o soro no tampão de bloqueio e adicionar 0,1 ml às primeiras cavidades da placa. Realizar diluições em série (1:2) ao longo da placa. Incubar por 1 hora a 37°C.
6. Lavar 3 a 5 vezes com tampão de lavagem.
- 5 7. Diluir a combinação no tampão de bloqueio e adicionar 0,1 ml às cavidades da placa e incubar por 1 hora a 37°C.
8. Lavar 3 a 5 vezes com tampão de lavagem.
9. Adicionar o substrato.
10. Medir a absorbância de luz com um espectrofotômetro.
- 10 11. As cavidades em que o antígeno não foi adicionado são usados como brancos.
12. O controle positivo e negativo do soro do suíno pode também ser usado em cada teste.
- O protocolo de Western Blot preferido é como segue:
- 15 1. Processar o antígeno em 12% de SDS-PAGE e transferir para a membrana de nitrocelulose.
2. Colocar a membrana no tampão de bloqueio por 2 horas.
3. Remover o tampão de bloqueio e enxaguar com PBS por 1 minuto.
- 20 4. Diluir o soro no tampão de bloqueio e adicionar à membrana. Incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
5. Lavar 3 vezes com o tampão de lavagem (5 minutos para cada lavagem).
- 25 6. Diluir a combinação no tampão de bloqueio e adicionar à membrana. Incubar por 1 hora à temperatura ambiente.
7. Lavar 3 vezes com o tampão de lavagem.
8. Adicionar o substrato por 10 minutos ou até ocorrer uma forte ligação.
9. Enxaguar com PBS.
- 30 10. Soprar ar seco e armazenar no escuro.

A bactéria *L. intracellularis* de origem Européia da presente invenção, ou componentes derivados de tal bactéria, podem também ser usa-

23

dos para preparar anti-soro ou anticorpos para uso de diagnóstico, uso profilático ou terapêutico. A bactéria *L. intracellularis* de origem Européia da presente invenção, ou componentes derivados de tal bactéria, podem ser administrados a um animal não-humano, em uma quantidade eficaz para proporcionar uma resposta imune e o anti-soro ou plasma contendo anticorpos para a bactéria *L. intracellularis*, ou componentes derivados da mesma, podem ser coletados de acordo com métodos descritos na técnica e aqui descritos.

A presente invenção é ainda descrita pelos exemplos seguintes, os quais são fornecidos apenas para fins ilustrativos e não são construídos como limitativos. De fato, outras variantes da invenção serão facilmente evidentes para aqueles versados na técnica.

Todas as publicações e patentes aqui citadas são também aqui integralmente incorporadas por meio dessas referências.

Exemplo 1 - Produção de Vacina de *L. intracellularis*

15 Isolamento e Atenuação da *L. intracellularis* de Intestinos de Porcos da Europa com Enteropatia Proliferativa Suína (PPE).

O isolado de *L. intracellularis* virulento, DK 15540 (DK 15540, DK-15540 e 15540 são aqui usados de forma permutável) foi isolado pela Universidade de Minnesota de um homogeneizado do ílio de um porco Dinamarquês infectado com enteropatia hemorrágica suína aguda. Esse isolado foi depois depositado sob as condições do Tratado de Budapeste no American Type Culture Collection, 10801, University Boulevard, Manassas, Virgínia, 20110-2209, em 9 de janeiro de 2003 e foi atribuído o número de acesso PTA-4927. O processo de isolamento incluiu a raspagem da mucosa do ílio, homogeneização, tripsinização por 30 minutos e passagem através de um triturador de tecido. O homogeneizado de ílio foi depois passado através de uma série de filtros consistindo de 5,0, 1,0 e 0,65 μm . O homogeneizado foi diluído em um tampão de glutamato de fosfato de sacarose com 10% de soro fetal bovino (FBS). Frações de (6 x 1 mL) do homogeneizado foram produzidas e armazenadas à temperatura inferior a -70°C . O homogeneizado foi usado como inóculo para infectar frascos T de 75 cm^2 de células McCoy. As culturas foram monitoradas diariamente quanto à infecção por

25
célula McCoy, mediante raspagem de monocamadas de células McCoy, li-
sando as células através de tratamento com cloreto de potássio e colocando
o grânulo de célula concentrado em lâminas de microscópio manchadas pelo
procedimento de IFA, usando anticorpos monoclonais específicos para a *L.*
5 *intracellularis*. Depois de onze passagens por culturas de células dependen-
tes de suporte, o inóculo da passagem onze foi transferido para um frasco
giratório de 250 ml contendo células McCoy e cultivado em suspensão até a
colheita. O isolado Dinamarquês de *L. intracellularis*, (Acesso do ATCC Nº
PTA 4297) foi atenuado através de contínua passagem *in vitro* nas células
10 de McCoy durante 80 semanas e testado quanto à identidade por anticorpos
monoclonais. O isolado atenuado foi designado por B3903 (B3903, B 3903 e
B-3903 são aqui usados de forma permutável). O isolado B3903 foi deposi-
tado sob as condições do Tratado de Budapeste no American Type Culture
Collection, 10801, University Boulevard, Manassas, Virgínia, 20110-2209,
15 em 9 de janeiro de 2003 e foi atribuído pelo ATCC o número de acesso PTA-
4926.

Culturas:

Identificação

20 As características de exigências de cultura, reações de PCR e
reações de anticorpo monoclonal foram usadas para identificar materiais do
tipo *L. intracellularis* Master e Working Seed.

Pureza:

25 A pureza dos materiais Master Seed e Working Seed da *L. intra-*
cellularis foi determinada mediante exame de culturas com manchas de anti-
corpo monoclonal, testes de agentes estranhos convencionais para bactérias
e vírus e através de testes de esterilidade de micoplasma.

Virulência

30 Master Seeds de *L. intracellularis* não foram virulentas conforme
demonstrado pela falta de capacidade de passagem do inóculo de Master
Seed e Back de produzir sinais e lesões graves que são observadas em suí-
nos sensíveis, após a exposição da *L. intracellularis* virulenta, conforme pos-
teriormente ilustrado no Exemplo 2, apresentado a seguir.

Variedade das Subculturas

O material final colhido da produção de *L. intracellularis*, não excedeu onze passagens do Master Seed.

Composição do Meio

- 5 A matéria-prima de célula EU McCoy Master (MCS) foi cultivada e mantida em um meio Eagle modificado da Dulbecco, com F12 fortificado de Ham (DMEM/F12) e 1-10% (vol/vol) de soro bovino recém-nascido (NBS) ou soro fetal bovino (FBS) (meio de cultura e de manutenção de célula).

- 10 Os materiais de Master e Working Seed foram armazenados em DMEM/F12 com 1-10% (vol/vol) de NBS ou FBS e 5-15% (vol/vol) de glicerol (meio de armazenamento de Master e Working Seed).

O produto final colhido foi armazenado com um estabilizador de gelatina de sacarose (SGS) (meio de armazenamento do produto final)

Propagação

- 15 As culturas de Master e Working Seed da *L. intracellularis* foram propagadas em EU McCoy (MCS) usando o meio de cultura e manutenção de célula, conforme descrito acima e armazenado a uma temperatura inferior a cerca de -35°C.

Fonte ou Procedência do Tecido

- 20 A semente de *L. intracellularis* e a produção de organismos foram cultivadas no McCoy Master Cell Stock (ATCC de acesso N° CRL 1696, número do lote F-10422). O estoque de célula mastócita foi identificado como 3894MMCSS na passagem X. O estoque de célula mastócita foi passado por mais seis vezes e identificado como EU McCoy MCS, passagem X+0, 25 depois armazenado à temperatura de -70°C $\pm$ 5°C ou sob temperaturas mais frias. A produção de vacina foi feita nas subculturas da linha celular EU McCoy MCS, através da 40ª passagem.

Recipientes da Cultura

- 30 As células EU McCoy MCS foram propagadas em frascos de cultura de tecido com área superficial de 25-250 cm², em cubos de célula Costar, em garrafas cilíndricas com 850 cm² a 2.250 cm², em frascos giratórios de até 40 L de capacidade e em biorreatores tendo de 3L a 500 L de



capacidade.

As culturas das sementes de *L. intracellularis* foram cultivadas em frascos giratórios de 250-40.000 mL, em garrafas cilíndricas com 850 cm² a 2.250 cm², em frascos de cultura de tecido com área superficial de 25-150 cm² ou em biorreatores tendo de 3L a 500 L de capacidade.

As culturas de produção de *L. intracellularis* foram cultivadas em frascos giratórios de 6L a 40L ou em biorreatores tendo capacidade de 3L a 500L.

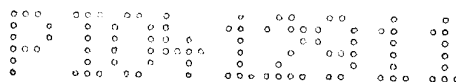
Métodos de Preparação de Suspensões para Semeadura ou Inoculação

10 Semeadura de Culturas

Master Seeds ou Working Seeds expandidas da *L. intracellularis* congelada ou fresca foram descongeladas à temperatura ambiente (25°C ± 3°C) ou à temperatura de 37°C ± 2°C. Biorreatores, frascos giratórios ou garrafas previamente semeados com células McCoy, com uma densidade de 15 célula de 50.000 a 500.000 células/mL, foram infectadas com *L. intracellularis* em uma concentração de 1 a 10% (vol/vol) ou MOI de 0,08 a 1,0. A cultura infectada foi incubada sob concentrações de oxigênio reduzidas, mediante sobreposição de uma mistura gasosa composta de 86% de N₂, 4% de H₂ e 10% de CO₂. A cultura foi incubada durante 3 a 10 dias a 37°C ± 2°C, pH de 20 6,7 a 7,3 e com contínua agitação (10 a 100 rpm), para manter uma adequada mistura para as células que permanecem em suspensão.

Culturas de Produção

Master Seeds ou Working Seeds expandidas de *L. intracellularis* congelada ou fresca foram descongeladas à temperatura ambiente (25°C ± 25 3°C) ou à temperatura de 37°C ± 2°C. Biorreatores ou frascos giratórios de 3L a 500L de capacidade previamente semeados (0 a 7 dias) com células McCoy, com uma densidade de célula de 50.000 a 500.000 células/mL, foram infectadas com *L. intracellularis* em uma concentração de 1 a 10% (vol/vol) ou MOI de 0,08 a 1,0. A cultura infectada foi incubada sob concentrações de oxigênio reduzidas, mediante sobreposição ou espalhamento de 30 uma mistura gasosa composta de 96% de N₂ e 4% de H₂. A cultura foi incubada durante 3 a 8 dias a 37°C ± 2°C, pH de 6,7 a 7,3 e com contínua agita-



ção (10 a 100 rpm), para manter uma adequada mistura para as células que permanecem em suspensão.

Técnicas de Inoculação para Semeadura e Produção de Culturas

Semeadura de Culturas

- 5 Até 10% (vol/vol) de Master Seeds ou Working Seeds são inoculadas (MOI = 0,08 a 1,0) dentro de biorreatores, frascos giratórios ou garrafas semeadas com células McCoy durante 0-7 dias, em um meio de cultura.

Produção de Culturas

- 10 Até 10% (vol/vol) de Production Seed (semente de produção) foram inoculadas (MOI = 0,08 a 1,0) dentro de um apropriado volume de um meio de cultura semeado com células McCoy durante 0-7 dias, com uma apropriada densidade de célula McCoy, em vasos de capacidade de 3L a 500L.

Incubação de Microorganismos

- 15 As culturas foram incubadas a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 a 10 dias, em uma atmosfera reduzida de oxigênio, com agitação para manter a suspensão. Uma quantidade adicional do meio e/ou de células McCoy pode ser adicionada para continuar o processo de cultura.

- 20 As culturas foram observadas macroscopicamente durante o período de incubação para se evidenciar crescimento ou sinais anormais de contaminação.

Colheita

Manipulação e Preparação das Culturas

- 25 As culturas foram examinadas quanto a sinais de adequado crescimento bacteriano mediante manchamento de anticorpo por fluorescência indireta (IFA). As culturas que estavam prontas para a colheita mostraram um índice de infecciosidade de célula de 60 a 100%. O percentual de infecciosidade foi determinado mediante observação de pelo menos três campos, cada campo contendo suficientes células McCoy para preencher pelo menos 80% da área. Para ser considerada infectada, aproximadamente 30 50% da célula deve ser enchida com bactéria.

A potência da cultura colhida é testada mediante titulação da amostra em células McCoy, as quais são fixadas e manchadas usando es-

pecífico anticorpo monoclonal (anticorpo monoclonal anti-*L. intracellularis*, VPM 53, lote 31599 ou equivalente; conjugado fluoresceína-anti-IgG de camundongo (FITC) (ICN N° 55499) após 6 dias de incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

- 5 As culturas foram examinadas visualmente quanto a quaisquer sinais óbvios de contaminação. A colheita ocorreu 3 a 10 dias depois da inoculação.

Técnicas e Especificações da Colheita

- 10 Os conteúdos de célula e fluido no biorreator, frascos giratórios e garrafas de produção de cultura foram parcialmente ou integralmente coletados em um vaso de recepção esterilizado. Cada biorreator, frasco giratório e garrafa de produção de cultura foi colhido individualmente ou os conteúdos de diversos vasos foram agrupados com a adição de SGS e armazenados à temperatura de 1°C a 7°C ou sob temperaturas mais frias. A cultura se produção colhida foi testada quanto à potência mediante TCID_{50} e a identificação através de IFA.

15 As culturas produzidas exibiram pelo menos 4,9 $\text{TCID}_{50}/\text{mL}$ por manchamento por IFA e foram isentas de qualquer evidência de contaminação após observação microscópica.

Preparação do Produto de Vacina

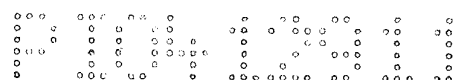
20 Métodos de Concentração

O produto de vacina pode ser concentrado por diversos métodos, por exemplo, deixando a cultura sedimentar com subsequente decantação do sobrenadante, através de filtração por membrana ($0,22\ \mu\text{m}$ ou menor), perfusão ou mediante centrifugação.

25 Estabilizador de Gelatina de Sacarose (SGS)

Uma solução de gelatina hidrolisada é preparada mediante mistura de gelatina com água desionizada ou apenas água de injeção, com aproximadamente 25% do volume total final do tamanho de lote de SGS e hidrólise em uma autoclave durante 120 minutos, à temperatura de 121°C .

- 30 A solução de gelatina hidrolisada ($40,0\ \text{g/L}$) foi depois misturada com água desionizada ou água de injeção, com aproximadamente 75% do volume total final do tamanho de lote de SGS. Em seguida, foram adiciona-



dos hidróxido de potássio (AR) (0,548 g/L), ácido L-glutâmico (1,440 g/L), fosfato de dipotássio (AR) (2,508 g/L), fosfato diácido de potássio (AR) (1,030 g/L) e sacarose (AR) (150,00 g/L) e a solução foi intensamente misturada. O pH do estabilizador foi depois ajustado para 6,8 a 7,0 com soluções

5 de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio. A seguir, foi adicionada água desionizada ou água de injeção, completando 100% do volume final desejado de SGS. O estabilizador completo foi intensamente misturado e toda a solução foi esterilizada mediante filtração através de um filtro de 0,1 micron.

Exemplo de um Conjunto de Unidades para produzir uma Série, é mostrado

10 na Tabela 1:

Tabela 1

<i>L. intracellularis</i>	200.000-300.000 mL
Estabilizador de gelatina de sacarose (SGS)	100.000 mL (25% vol/vol)
DMEM/F12 (pode ser adicionado para padronizar o produto)	0-150.000 mL
Volume total	400.000 mL

O volume de uma série média foi de 50L a 500L.

Liofilização

O produto de vacina foi liofilizado de acordo com o procedimento

15 destacado na Tabela 2, para um ciclo de 10 doses (carga de 6,0 mL) ou Tabela 3, para um ciclo de 50-100 doses (carga de 10,0 mL).

Tabela 2

Etapas	°C	Velocidade (minutos)	Manutenção (minutos)	Pressão (mT)
Pré-resfriamento*	5°	Na	Na	Atm
congelamento	-47° ± 3°	O mais rápido possível	150	Atm
1° congelamento, 1°	-15° ± 2°	120	120	100-150
1° congelamento, 2°	0° ± 2°	120	180	100-150
2° congelamento, 1°	32° ± 2°	240	180	60-80
2° congelamento, 2°	26° ± 2°	240	O mais rápido possível	60-80



Tempo total: 1352 minutos (22,5 horas)

* As prateleiras são pré-resfriadas a $5^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante a introdução do liofilizador.

Tabela 3

Etapas	$^{\circ}\text{C}$	Velocidade (minutos)	Manutenção (minutos)	Pressão (mT)
Pré-resfriamento*	5°	N/A	N/A	Atm
congelamento	$-48^{\circ} \pm 3^{\circ}$	60	90	Atm
1º congelamento	$-15^{\circ} \pm 2^{\circ}$	60	1500	100-150
2º congelamento	$26^{\circ} \pm 2^{\circ}$	60	600	60-80

5 Tempo total: 2370 minutos (39,5 horas)

* As prateleiras são pré-resfriadas a $5^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante a introdução do liofilizador

Exemplo 2

Segurança da Vacina de *L. intracellularis*

10 Finalidade:

Os objetivos desse estudo foram duplos. O primeiro objetivo desse estudo foi observar e comparar a incidência da doença causada por três diferentes baixas transferências de isolados (duas de origem dos U.S. e uma de origem Européia) de *L. intracellularis* em porcos de 6 ½ semanas de idade. O segundo objetivo foi observar a segurança de duas transferências de isolados (ambas de origem Européia) de *L. intracellularis* em porcos de 6 ½ semanas de idade.

15

Materiais e Métodos

Substâncias de Teste

20

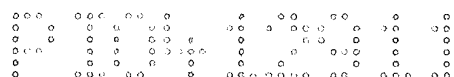
1. Isolado de origem dos U.S. de baixa transferência de *L. intracellularis*, N343;

2. Isolado de origem dos U.S. de baixa transferência de *L. intracellularis*, N101494;

25

3. Isolado de origem da Europa de baixa transferência de *L. intracellularis*, DK 15540 p20;

4. Isolado de origem da Europa de alta transferência de *L. intra-*



cellularis, DK 15540 p60;

5. Isolado de origem da Europa de alta transferência de *L. intracellularis*, DK 15540 p80 (designação de Master Seed B3903).

Formulação das Substâncias de Teste

5 Os isolados de baixa transferência foram cultivados continuamente durante 10-20 semanas após o isolamento em uma suspensão de célula McCoy. Os isolados de alta transferência foram cultivados continuamente durante 60-80 semanas após o isolamento em uma suspensão de célula McCoy. Todas as culturas foram colhidas através de centrifugação, a
10 10.000 rpm, durante 15 minutos. Os grânulos da cultura de célula McCoy contendo *Lawsonia* foram novamente suspensos em uma solução de sacarose-fosfato-glutamina (SPG) com 10% de FBS.

Armazenamento das Substâncias de Teste

15 As culturas colhidas foram armazenadas à temperatura de -70°C até o dia do ataque. As culturas de ataque do mesmo isolado, mas de várias datas de colheitas, foram descongeladas e misturadas em garrafas de plástico de vacina e armazenadas à temperatura de 4°C ou em gelo, até o momento do ataque.

Ensaio das Substâncias de Teste

20 O ensaio de TCID₅₀ foi executado em todos os isolados de ataque agrupados no momento do ataque (dia 0). As titulações médias ($n = 3$) (TCID₅₀/mL) foram como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4

Substância de Teste	Titulação Média (TCID ₅₀ /ml)
<i>L. intracellularis</i> N343	6,4
<i>L. intracellularis</i> N101494	6,1
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p20	6,2
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p60	6,87
<i>L. intracellularis</i> DK 15540 p80	7,4

Modelo do Estudo

25 O estudo consistiu de cinco grupos experimentais e um grupo de controle. No dia 0 do estudo, o Grupo 1 (10 porcos, 6 ½ semanas de idade)



recebeu 10 mL ou equivalente de uma dose intragástrica (IG) do isolado de origem U.S. N343, de *L. intracellularis* de baixa transferência. O Grupo 2 (10 porcos, 6 ½ semanas de idade) recebeu uma dose IG de 10 mL ou equivalente do isolado de origem U.S. N101494, de *L. intracellularis* de baixa transferência. O Grupo 3 (10 porcos, 6 ½ semanas de idade) recebeu uma dose IG de 10 mL ou equivalente do isolado de origem Européia DK15540 p20, de *L. intracellularis* de baixa transferência. O Grupo 4 (10 porcos, 6 ½ semanas de idade) recebeu uma dose IG de 10 mL ou equivalente do isolado de origem Européia DK15540 p60, de *L. intracellularis* de alta transferência. O Grupo 5 (20 porcos, 6 semanas de idade) recebeu uma dose IG de 10 mL ou equivalente do isolado de origem Européia DK15540 p80, de *L. intracellularis* de alta transferência. O Grupo 6 (10 porcos, 6 ½ semanas de idade) designado como "Controle Rigoroso", não recebeu tratamento.

As observações de saúde diárias foram feitas do início do estudo ao dia do ataque aos animais de apropriados testes. A saúde clínica, incluindo os itens de comportamento, apetite, condição do corpo, cobertura do pelo e consistência das fezes em uma escala de 1 a 4, foram registrados diariamente a partir do dia do ataque (dia 0) até o término do estudo (dia 21). Os ganhos médios de peso diário (ADWG) foram calculados a partir do dia do ataque (dia 0) até o término do estudo (dia 21). O derramamento fecal de *L. intracellularis* foi avaliado nos dias 0, 7, 14 e 21. O único animal que morreu (do Grupo 1) em todo o estudo foi examinado quanto às lesões graves e microscópicas. A morte foi determinada como sendo devido às lesões associadas com a PPE, confirmado por histologia e análise de PCR; o animal não foi substituído. A análise quantitativa do teor de Lawsonia nas fezes foi avaliada através de procedimento de PCR, junto com avaliação histológica para a *L. intracellularis* no íleo e cólon. O soro foi coletado nos dias 0, 7, 14 e 21 do estudo.

Resultados

Resumo dos Resultados do Estudo

Tabela 5

(1ª parte)

Grupo	Tratamento	Nº de Porcos	Titulação (TCID ₅₀ /mL)	Serologia	Derramamento Fecal
1	N343	9	7,4	19%	11%
2	N101494	10	7,1	10%	10%
3	DK15540p20	10	7,2	18%	13%
4	DK15540p60	10	7,87	5%	0%
5	DK15540p80	20	8,4	0%	0%
6	Controle Rigoroso	10	0	0%	0%

(2ª parte)

Grupo	PCR	FA	Histologia	Lesões Graves	ADWG	Marcações Clínicas
1	0%	11%	44%	1	0,61	5,23
2	10%	30%	30%	1,2	0,8	5,15
3	30%	10%	20%	1,2	0,86	5,01
4	0%	0%	10%	1	0,9	5
5	0%	0%	0%	1	1,05	5
6	0%	0%	0%	1,05	0,91	5

Observações Gerais

- 5 As observações de saúde diárias foram feitas até o ataque. A condição clínica dos animais foi avaliada diariamente após o ataque, durante o estudo. As observações incluíam: comportamento, apetite, condição do corpo, cobertura do pelo e consistência fecal. As condições clínicas desses animais foram avaliadas com base em um sistema de pontuação numérica,
- 10 o qual reflete a gravidade da doença. As classificações variaram de 1 a 4 para cada parâmetro. Uma classificação de 1 foi dada a um animal com uma aparência de saúde normal, uma classificação de 3 para um animal demonstrando graves sinais clínicos e uma classificação de 4 para um animal que faleceu. A marcação diária média para os controles rigorosos, DK15540 p60
- 15 e DK15540 p80 foi de 5,0. As marcações diárias médias para o material de baixa transferência foi: N343 (5,23); N101494 (5,15) e DK1540 p20 (5,01). A

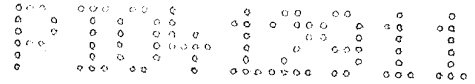
análise estatística desses resultados não indicou quaisquer diferenças entre os grupos de tratamento e controle usando o Teste da Soma de Kruskal-Wallis Rank.

Ganhos Médios de Peso Diário (ADWG)

5 Os ganhos médios de peso diário foram calculados a partir do momento do ataque (dia 0) até o término do estudo (dia 21). O ganho médio de peso por dia para o grupo de controle rigoroso foi de 0,9 libra. O ganho médio de peso diário para os grupos de tratamento de baixa transferência foi de apenas 0,6 libra/dia (N343), 0,8 libra/dia (N101494) e 0,86 libra/dia 10 (DK15540 p20). Os grupos de tratamento de alta transferência revelaram o mesmo ou um aumentado ganho médio de peso por dia, comparado ao grupo de controle rigoroso, que não recebeu ataque, com 0,9 libra/dia (DK 15540 p60) e 1,05 libra/dia (DK15540 p80), respectivamente. A diferença média nos ganhos médios de peso diário foi significativamente inferior no 15 grupo de tratamento N343, comparado aos grupos de tratamento de maior transferência (DK15540 p60 e p80) e grupo de controle rigoroso, no dia 21 do estudo. (Teste de qui quadrado de Pearson: $p < 0,05$).

Conversão do Soro

20 A conversão do soro para exposição à *Lawsonia* em porcos foi medida mediante teste da presença de anticorpos anti-*Lawsonia*, usando um ensaio de IFAT. No dia 0, apenas o grupo de tratamento N343 observou uma detectável conversão de soro em 2/10 dos porcos. No dia 7, observou-se 2/9 dos porcos (N343) e 1/10 dos porcos (DK15540 p20) de IFA positivo para os anticorpos de *Lawsonia*. No dia 14, 2/9 dos porcos foram IFA positi- 25 vos no grupo de tratamento N343, 1/10 no DK15540 p20 e p60, respectivamente. No dia 21, observou-se que 1/10 dos porcos (N343), 4/10 dos porcos (N101494) e 6/10 dos porcos (DK15540 p20) foram IFA positivos, enquanto os grupos de tratamento de alta transferência (DK 15540 p60 e p80) não mostraram conversão de soro detectável. A conversão de soro para exposi- 30 ção à *Lawsonia* aumentou nos grupos de tratamento que receberam *L. intracellularis* de baixa transferência de isolados dos U.S. e da Europa no dia 21 do estudo.



Derramamento Fecal

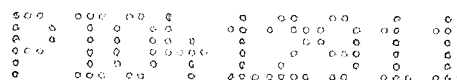
O teste de PCR das fezes demonstrou que o derramamento de *L. intracellularis* começou no dia 14, onde 4/9 no N343, 4/10 no N101494 e 5/10 no DK15540 p20 dos animais de baixa transferência testaram de forma positiva. Os grupos de tratamento de alta transferência e de controle rigoroso foram de PCR negativo no dia 14. No dia 21, o grupo de tratamento DK15540 p20 tinha 1 animal de PCR positivo, enquanto todos os outros grupos de tratamento e de controle foram de PCR negativo. Nenhuma evidência de derramamento foi observada nos grupos de isolados de alta transferência (DK15540 p60 e p80) usando PCR em todo o estudo. Os animais de PCR positivo indicaram um ativo derramamento de *Lawsonia* em suas fezes, onde foi mais significativo nos grupos de isolados de baixa transferência (N343, N101494 e DK15540 p20) no dia 14 do estudo, do que nos grupos de isolados de alta transferência e controle rigoroso. (Teste de qui quadrado de Pearson: $p < 0,05$).

PCR no dia 21: Íleos e Cóloons

O teste de PCR de raspagens da mucosa de íleos e cóloons foi executado após a necropsia (dia 21). As amostras que foram PCR positivo para a colonização de *L. intracellularis* foram (2/10 de cóloons) em N101494 e (2/10 de íleos e 4/10 de cóloons) nos grupos de isolados DK 15540 p20 de baixa transferência. Todos os outros grupos de tratamento e controle foram PCR negativo nos tecidos no dia 21 do estudo. Os resultados indicaram que os íleos e cóloons de porcos em DK15540 p20 foram significativamente mais colonizados com *L. intracellularis* comparado a todos os grupos de tratamento e controle (*Teste do qui quadrado de Pearson, $p < 0,05$).

Histologia

Seções do íleo e cólon terminal foram coletadas na necropsia (dia 21) e colocadas em tampão de formol para análise histológica. A presença de bactéria intracelular e de hiperplasia de folículo foi observada nos tecidos manchados com Hematoxilin e Eosin (H&E) e reagentes de prata de Warthin-Starry de 4/9 porcos (N343), 2/10 porcos (N101494), 2/10 porcos (DK15540 p60) e 1/20 porcos (DK15540 p80). O desenvolvimento das le-



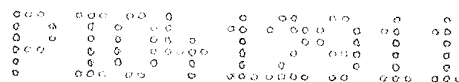
sões foi confirmado por meio de manchamento fluorescente de anticorpo usando anticorpos monoclonais contra *L. intracellularis* em 1/9 porcos (N343), 3/10 porcos (N101494) e 1/10 porcos (DK15540 p60). O teste de FA não detectou lesões causadas pela bactéria *Lawsonia* nos cólons de todos os grupos de tratamento e controle. Os resultados do teste FA indicaram significativo desenvolvimento de lesões nos íleos de porcos no grupo de tratamento N101494, comparado a todos os grupos de tratamento e controle. O manchamento de prata de H&E mostrou significativo desenvolvimento de lesão associado com a PPE no grupo de tratamento N343, comparado a todos os grupos de tratamento e controle (Teste do qui quadrado de Pearson, $p < 0,05$).

Marcações Graves

Os íleos e cólons foram marcados no momento da necropsia (dia 21) quanto às lesões associadas com a PPE. Os tecidos receberam uma classificação de 1 para um aspecto normal (nenhum desenvolvimento de lesão), uma classificação de 2 para lesões que demonstravam um espessamento brando, 3 para espessamento moderado e uma classificação de 4 para espessamento grave. Os controles rigorosos tiveram uma classificação clínica média de 1,05, N343 (1,0), N101494 (1,2), DK15540 p20 (1,2) e DK15540 p60 e p80 (1,0). As classificações para as lesões graves médias não indicaram diferença estatística entre os grupos de tratamento e controle usando o teste de ANOVA para múltiplas comparações.

Conclusões

Com base nos dados coletados, esse estudo demonstrou que os porcos atacados com uma dose de baixa transferência de N343, N101494 e DK15540 com um $TCID_{50}$ maior que 1×10^7 bactérias/dose aumenta a incidência de PPE nesses animais. Os isolados de alta transferência (DK15540 p60 e p80) que proporcionaram aos porcos de mesma idade um $TCID_{50}$ maior que 1×10^7 , foram provados como sendo seguros e mostraram redução da colonização e desenvolvimento de lesão associado com a PPE. Essa conclusão foi baseada no PCR da mucosa do íleo, histopatologia e manchas de FA de seções do tecido.



Uma redução do derramamento de *L. intracellularis* nas fezes determinado por PCR foi evidente nos isolados de alta transferência, comparado aos isolados de baixa transferência. Os ganhos de peso médio diários calculados para todos os grupos de tratamento e controle fundamenta essa conclusão mediante demonstração de ganho de peso uniforme diário positivo nos grupos que receberam o isolado de alta transferência e de controles rigorosos, comparado aos grupos que receberam isolados de baixa transferência, especialmente os animais no grupo de tratamento N343. Essa observação indica redução de ganhos de peso nos animais que receberam material de baixa transferência, o que suporta um adequado e similar desempenho de crescimento de animais que receberam material de alta transferência em relação aos animais que não receberam material de ataque. Quando comparado aos controles rigorosos, os isolados de alta transferência não mostraram impacto negativo no ganho de peso e saúde global baseado nas marcações clínicas.

Exemplo 3

Eficácia e Mínima Titulação Protetora

Finalidade:

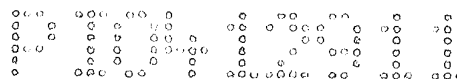
Os objetivos desse estudo foram de determinar a mínima titulação protetora de uma vacina que compreende o isolado B3903 (liofilizado) (DK15540, transferência 80), ("as denominações vacina B3903 (Liofilizada)" e "vacina B3903" são aqui) usadas de forma permutável) administrado oralmente em porcos de 3 semanas de idade, para demonstrar a eficácia contra um ataque de cultura pura heteróloga virulenta com *L. intracellularis* de baixa transferência, o agente causador da Enteropatia Proliferativa de Porcos (PPE) em suínos.

Materiais e Métodos

Substância de Teste: Cultura viva atenuada de *L. intracellularis* (isolado B3903).

Formulação da Vacina B3903 (Liofilizada)

Os isolados DK 15540 foram cultivados continuamente durante 80 semanas após o isolamento em suspensão de célula McCoy. Todas as culturas foram colhidas através de centrifugação, a 10.000 rpm, durante 15



minutos. Os grânulos de cultura de célula McCoy contendo Lawsonia foram novamente suspensos em uma solução de sacarose-fosfato-glutamina (SPG), com 10% de FBS. A dissecação foi executada conforme descrito no Exemplo 1, acima. O produto liofilizado é reconstituído em água, q.s. ad 2,0 ml, para injeções.

Armazenamento da Vacina B3903 (Liofilizada)

A vacina foi armazenada à temperatura de 2-8°C, até estar pronta para uso. Após a nova suspensão, a vacina foi armazenada em gelo, até a administração.

Doses da Vacina B3903 (Liofilizada)

- Dose alta (Grupo de Tratamento 1): 1 x 2 ml (6,0 logs/dose), através de administração oral direta no dia 0 do estudo.

- Dose Média (Grupo de Tratamento 2): 1 x 2 ml (4,9 logs/dose) através de administração oral direta no dia 0 do estudo.

- Dose Baixa (Grupo de Tratamento 3): 1 x 2 ml (3,8 logs/dose) através de administração oral direta no dia 0 do estudo.

Substância de Teste: Placebo

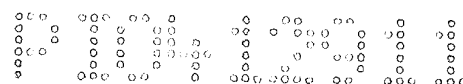
Um placebo consistindo em células de cultura de tecido McCoy não-infectadas, suspensas no meio de cultura DMEM/F12, fortificado com 5% de NBS, foi fornecido para os Grupos de Tratamento 4 (controle de ataque) e 5 (controle negativo) no dia 0 do estudo. Essa substância foi administrada a pequenos porquinhos no Grupo de Tratamento 4 através de administração direta oral e fornecido 1 x 2 mL de placebo por animal de teste.

Substância de Teste: *L. intracellularis* N101494 de ataque virulento

A bactéria *L. intracellularis* N101494 foi obtida de intestinos de um porco de 12 semanas de idade, de uma fazenda de Indiana (Patente U.S. Nº 5.714.375).

Formulação da *L. intracellularis* de Ataque Virulento

O material de ataque de *L. intracellularis* foi cultivado continuamente em uma suspensão de célula McCoy em não mais de 30 transferências após o isolamento inicial de tecido de intestino infectado. As culturas ativas (2 x 3L) identificadas como SF 1422 e SF 1423, além de 1L de



SF1421, foram cultivadas em uma suspensão de células McCoy durante 7 dias, com um grau de infecção de célula McCoy de 15-30%. No dia do ataque (dia 21), as culturas ativas foram colhidas mediante centrifugação a 10.000 rpm durante 15 minutos e os grânulos de célula foram novamente suspensos em um volume total de 350 mL com um estabilizador de SPG. A cultura ativa colhida foi agrupada com 300 mL de matérias-primas concentradas 10X a 20X de baixa transferência de N101494, em diversas transferências (24 a 27 passagens após o isolamento).

Armazenamento de *L. intracellularis* N101494 de Ataque Virulento

As formulações finais prontas para o ataque foram armazenadas à temperatura de 2-8°C ou em gelo, até a inoculação.

Titulações Pré/Pós-Vacinação e de Ataque

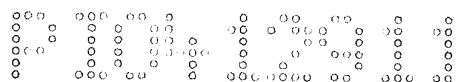
Os resultados do teste de TCID₅₀ examinaram a quantidade de *L. intracellularis* administrada a cada animal de teste por dose, durante a vacinação e ataque. As titulações médias (n=5) das pré e pós-titulações para a vacina B3903 e material de ataque (*L. intracellularis* N101494) foram como segue na Tabela 6.

Tabela 6

Grupo	Tratamento (logs/dose)	Logs/dose médio (2 ml) Pré-vacinação TCID ₅₀ /mL	Logs/dose médio (2 ml) Pós-vacinação TCID ₅₀ /mL	Logs/dose Total médio
1	Dose alta de vacina B3903	6,07	5,89	6,0
2	Dose média de vacina B3903	4,94	4,84	4,9
3	Dose baixa de vacina B3903	3,9	3,5	3,8
4	Controles de ataque	7,85	7,57	7,71

Modelo do Estudo

Sessenta e cinco porquinhos saudáveis, desmamados, de *L. intracellularis* negativo, de 3 semanas de idade, foram aleatoriamente divididos em 5 grupos de tratamento e alojados separadamente durante todo o



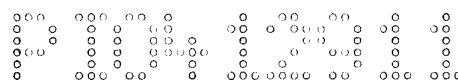
estudo. No dia 0, o grupo de tratamento 1 (15 porcos) recebeu uma dose de 2 ml (6,0 logs/dose) da vacina B3903 mediante administração oral direta. O grupo de tratamento 2 (15 porcos) recebeu uma dose de 1 x 2 mL de vacina B3903 titulada com 4,9 logs/dose, mediante administração oral direta. O grupo de tratamento 3 (15 porcos) recebeu uma dose de 1 x 2 mL de vacina B3903 titulada com 3,8 logs/dose, mediante administração oral direta.

Os grupos de tratamento 4 e 5 (10 porcos/grupo) receberam dose de 1 x 2 mL de placebo mediante administração oral direta.

No dia 21 do estudo (3 semanas pós-vacinação), os porcos do teste nos Grupos de Tratamento 1-4 receberam dose de 1 x 10 mL de cultura pura de baixa transferência, virulenta, de *L. intracellularis* heteróloga, isolado N101494, mediante gavagem gástrica.

No dia 42 do estudo, (3 semanas após o ataque), todos os grupos de tratamento (1-5) foram eutanizados e necropsiados quanto a análise de lesão grave e microscópica para a PPE.

Observações de saúde diárias foram feitas desde o início do estudo até o dia do ataque, para cada animal de teste. A saúde clínica (diarréia, comportamento e condição do corpo) foram registrados diariamente, a partir do dia do ataque (dia 21) ao término do estudo (dia 42). Os pesos foram tomados no dia da vacinação (dia 0), dia do ataque (dia 21) e no dia do término do estudo (dia 42) para calcular os ganhos de peso médio diário de cada grupo de tratamento. O derramamento fecal de *L. intracellularis* foi avaliado por meio de reação em cadeia por polimerase (PCR) através de teste de esfregaços fecais (f-PCR) nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 do estudo. Todos os animais eutanizados no término do estudo (dia 42) foram examinados quanto às lesões graves e microscópicas. A análise qualitativa do teor bacteriano nos tecidos foi avaliada por PCR (t-PCR) junto com a avaliação histológica da *L. intracellularis* no íleo, cólon, amígdala e nodo linfático mesentérico no dia 42 do estudo. O soro foi coletado nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 do estudo. O soro foi testado usando o teste de anticorpo fluorescente indireto (IFAT) para detectar os anticorpos anti-Lawsonia nos animais de teste. As comparações dos grupos de tratamento foram feitas mediante



análise de dados dos ganhos de peso médio diário após a vacinação e após o ataque, classificações clínicas, velocidades de conversão do soro (IFAT), colonização (t-PCR), derramamento fecal (f-PCR), lesões graves e desenvolvimento de lesão microscópica mediante imuno-histoquímica (IHC).

5 Resultados

Sumário dos Resultados Principais

Tabela 7

Grupo de tratamento	Porcos por grupo	Tratamento do grupo de ID (logs/dose)	Registro médio de lesões graves (íleo)	Registro médio de lesões graves (cólon)	Registro médio de microlesões (íleo)	Registro médio de microlesões (cólon)
1	15	Dose alta de vacina B3903 (6,0)	1,5 ab	1,2 a	0,2 ab	0,1 a
2	15	Dose média de vacina B3903 (4,9)	1,2 ab	1,0 a	0,4 ab	0,0 a
3	15	Dose baixa de vacina B3903 (3,8)	2,5 b	1,5 b	1,0 b	0,3 a
4	10	Controles de ataque	3,6 c	2,2 b	2,4 c	1,5 b
5	10	Controles rigorosos	1,0 a	1,0 a	0,0 a	0,0 a

*Letras similares não indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Os resultados finais do teste para cada grupo de tratamento revelou significativo desenvolvimento de lesões graves e microscópicas do íleo e do cólon em porcos de controle atacados, não-vacinados (Grupo 4), comparado a porcos vacinados desconsiderando a dose (alta, média, baixa) nos Grupos 1, 2 e 3 ($p < 0,05$). Os registros médios de lesões graves dos cólons vacinados de baixa dose não foram significativamente diferentes dos controles de ataque. O grupo de vacina de baixa dose (Grupo 3) é o único grupo de tratamento que recebeu vacina e teve significativo desenvolvimento de lesão (grave e microscópica) em comparação ao grupo de controle rigoroso

que não recebeu vacinação, placebo ou ataque no decorrer do estudo.

Registros Clínicos

- 5 Marcadores clínicos foram registrados para cada animal diariamente, a partir do dia do ataque (dia 21) ao dia da necropsia (dia 42). Os marcadores clínicos foram calculados para se obter um registro médio clínico diário, refletindo a gravidade e duração da doença entre os grupos de tratamento, devido à recepção de um ataque virulento de *L. intracellularis*. Os marcadores médios clínicos para cada grupo de tratamento são resumidos na Tabela 8.

10

Tabela 8

Grupo de tratamento	Identificação do grupo	Marcador médio clínico
1	Vacina B3903 - dose alta	3,1 a
2	Vacina B3903 - dose média	3,0 a
3	Vacina B3903 - dose baixa	3,0 a
4	Controle de ataque	3,0 a
5	Controle rigoroso	3,0 a

* Letras similares não indicam diferenças significativas entre os marcadores médios clínicos a partir do dia do ataque ao dia da necropsia ($p < 0,05$).

- 15 A análise estatística dos marcadores clínicos foi conseguida mediante reexame dos dados em relação aos grupos de tratamento que receberam marcadores médios clínicos usando ANOVA de 1 via. Não houve nenhuma evidência de significativas diferenças entre os controles de ataque não-vacinados e controles rigorosos, comparado aos grupos de vacina de alta, média e baixa dose.

Ganhos de Peso Médio Diário

20

- Os ganhos de peso médio diário (ADWG) foram calculados a partir do tempo da administração da vacina (dia 0) até a administração do ataque (dia 21) e até o término do estudo (dia 42). A análise estatística das diferenças de ganho de peso (lbs = libras) entre grupos de tratamento de alta dose de vacina e grupos de tratamento de controle de ataque sem vacina, revelou a evidência de uma significativa diferença do tempo de administração de ataque até a necropsia ($p < 0,05$). Os dados do peso se encontram
- 25

resumidos na tabela 9.

Tabela 9

Grupo de tratamento	Identificação do grupo	Peso inicial médio (lbs)	ADWG (dia 0-21) (lbs)	ADWG (dia 21-42) (lbs)	ADWG total (lbs)(vacinação à necropsia)
1	Dose alta de Vacina B3903	17,8 a	0,94 a	1,63 a	1,29 a
2	Dose média de vacina B3903	17,7 a	1,00 a	1,60 ab	1,30 a
3	Dose baixa de vacina B3903	18,0 a	0,94 a	1,48 ab	1,21 a
4	Controle de ataque	17,7 a	0,96 a	1,45 b	1,21 a
5	Controle rigoroso	17,7 a	0,94 a	1,63 ab	1,28 a

* Letras similares não indicam diferenças significativas entre os grupos de tratamento com ADWG a partir do dia da vacinação ao dia do ataque e do dia do ataque ao dia da necropsia ($p < 0,05$).

Conversão de soro (IFAT)

As amostras de soro foram coletadas semanalmente de todos os animais de teste em cada grupo de tratamento e testadas quanto à presença de anticorpos IgG anti-Lawsonia nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 do estudo.

- 10 As amostras de controle de IFAT positivo e negativo foram 100% precisas em todos os ensaios executados nesse estudo. Nos dias 0 a 21 (3 semanas após a vacinação), todos os animais de teste em cada grupo de tratamento foram IFA negativos. No dia 28 (1 dia após o ataque) do estudo, 1/15 (6,7%) dos animais de teste no grupo de tratamento de alta dose de vacina foram
- 15 IFA positivo, enquanto os outros testados foram IFA negativo. No dia 35 (2 semanas após o ataque) do estudo, 4/15 (26,7%) dos porcos nos grupos de tratamento de alta dose e média dose de vacina e 1/10 (10%) dos porcos no grupo de tratamento de controle de ataque sem vacina foram IFA positivo para os anticorpos de Lawsonia. Ambos os grupos de tratamento de controle
- 20 rigoroso e baixa dose de vacina foram IFA negativo no dia 35. No dia 42 (3

semanas após o ataque) do estudo, 8/10 (80%) dos porcos no grupo de controle de ataque, 6/15 (40%) dos porcos no grupo de dose média de vacina, 5/15 (33,3%) dos porcos no grupo de dose baixa de vacina e 3/15 (20%) dos porcos no grupo de alta dose de vacina foram IFA positivo. O grupo de controle rigoroso foi IFA negativo no término do estudo (dia 42).

Os dados de conversão de soro foram analisados usando o método estatístico de qui quadrado. Para os resultados obtidos no grupo de tratamento de controle rigoroso, um valor estatístico de qui quadrado não foi computado devido a que 100% das respostas negativas encontradas para cada animal de teste em todo o estudo. Nos grupos de tratamento que receberam uma vacina de placebo, os resultados de IFAT foram comparados usando o valor estatístico de qui quadrado com uma estimativa do exato valor de p (Monte-Carlo). Os resultados de IFAT positivo obtidos dos grupos de ataque que receberam um ataque de cultura pura virulenta foram significativamente superiores àqueles que receberam uma alta dose de vacina e baixa dose de vacina ($p < 0,05$) no dia 42 (3 semanas após o ataque) do estudo.

Derramamento Fecal de *L. intracellularis* (PCR)

Esfregaços fecais foram coletados semanalmente de todos os animais de teste em cada grupo de tratamento e testados quanto à presença de *L. intracellularis* através de PCR nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 do estudo. A extração de DNA positivo e negativo e os controles de reação por PCR foram 100% precisos para cada ensaio conduzido no presente estudo. Todos os animais de teste em cada grupo de tratamento foram de PCR fecal negativo para a *L. intracellularis* do dia 0 (vacinação) ao dia 21 (ataque). Os porcos do grupo de controle rigoroso permaneceram de PCR fecal negativo para a *L. intracellularis* nas suas fezes em todo o estudo. O derramamento fecal de *L. intracellularis* (PCR fecal positivo) foi evidente em diversos grupos de tratamento cada semana depois da inoculação do ataque. Estes resultados estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 10

Grupo de tratamento	Identificação do grupo	Dia 28 (1 semana após o ataque)	Dia 35 (2 semanas após o ataque)	Dia 35 (3 semanas após o ataque)
1	Dose alta de Vacina B3903	0/15 (0%) a	2/15 (13,3%) a	0/15 (0%) a
2	Dose média de vacina B3903	6/15 (40%) ab	5/15 (33,3%) a	0/15 (0%) a
3	Dose baixa de vacina B3903	4/15 (26,7%) ab	8/15 (53,3%) ab	2/15 (13,3%) ab
4	Controle de ataque	4/10 (40%) b	7/10 (70%) b	4/10 (40%) b
5	Controle rigoroso	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)

* Letras similares não indicam significativas diferenças entre os grupos de tratamento que receberam um ataque ($p < 0,05$).

- Análise estatística usando o valor estatístico de qui quadrado com uma estimativa do exato valor de p (Monte-Carlo), comparado às respostas positivas em cada grupo de tratamento de vacina em relação apenas ao grupo de controle de ataque sem vacina. Os resultados do grupo de controle rigoroso foram retirados das comparações dos grupos pelo fato de que cada porco foi 100% PCR fecal negativo para a *L. intracellularis* em todo o estudo. No dia 28 (1 semana após o ataque), os porcos que receberam uma alta dose de vacina apresentaram uma significativa menor quantidade de derramamento de *L. intracellularis* que os porcos atacados não-vacinados ($p = 0,017$). No dia 35 (2 semanas após o ataque), os porcos que receberam uma alta dose ($p = 0,0024$) e meia dose ($p = 0,041$) de vacina apresentaram uma significativa menor quantidade de derramamento de *L. intracellularis* nas suas fezes do que os porcos atacados não-vacinados. No dia 42 (término do estudo), novamente, os porcos que receberam uma alta e média dose de vacina ($p = 0,017$) apresentaram uma significativa menor quantidade de derramamento de *L. intracellularis* nas suas fezes, comparado aos porcos atacados não-vacinados. Os porcos no grupo de baixa dose não foram signi-

ficativamente menos PCR positivos do que os controles de ataque em qualquer dia após o ataque.

Colonização do Tecido de *L. intracellularis*

O teste de reação em cadeia por polimerase (PCR) de seções de tecido do íleo terminal, cólon, amígdala e nodo linfático mesentérico foi executado após a necropsia (dia 42 do estudo). No grupo de alta dose de vacina, 1/15 (6,7%) dos porcos foram PCR positivo para a colonização de *L. intracellularis* na amígdala, enquanto todos os outros grupos de tratamento foram PCR negativos. O teste de PCR de ileíte do tecido linfático mesentérico revelou que 3/10 (30%) dos porcos no grupo de controle de ataque não-vacinado foram positivos para a colonização de *L. intracellularis*, enquanto todos os outros grupos de tratamento foram PCR negativos.

O teste de PCR de ileíte de raspagens de mucosa do íleo terminal revelou para 4/10 (40%) dos porcos nos controles de ataque, 4/15 (26,7%) dos porcos no grupo de baixa dose de vacina, 2/15 (13,3%) dos porcos no grupo de dose média de vacina e 1/15 (6,7%) dos porcos no grupo de dose alta de vacina, PCR positivo para a colonização de *L. intracellularis*. O teste de PCR de ileíte do cólon revelou para 3/10 (30%) dos porcos nos controles de ataque, 5/15 (33,3%) dos porcos no grupo de baixa dose de vacina, 1/15 (6,7%) dos porcos no grupo de dose média de vacina e 2/15 (13,3%) dos porcos no grupo de dose alta de vacina, PCR positivo para a colonização de *L. intracellularis*. Nenhuma evidência de colonização de *L. intracellularis* foi observada nos tecidos do grupo de controle rigoroso.

A análise estatística dos resultados de PCR positivo para a ileíte foi comparada entre os grupos de tratamento usando o valor estatístico do qui quadrado com aproximação de Monte-Carlo do exato valor de p. Os resultados de PCR do nodo linfático mesentérico indicaram evidência de uma significativa diferença entre os grupos de controle de ataque não-vacinados e todos os grupos de tratamento que receberam tratamento de vacina ($p = 0,054$). Nenhuma significativa estatística foi evidente entre os grupos de tratamento na colonização de *L. intracellularis* no íleo, cólon ou amígdala no dia 42 do estudo.

Histologia (IHC/H&E)

Seções de 2 a 4 cm de comprimento de amígdala, nodo linfático mesentérico, íleo terminal e cólon foram coletadas na necropsia (dia 42) e colocadas em tampão de formol a 10% para análise histológica. A *Lawsonia intracellularis* não foi detectada por meio de manchamento de IHC de seções de amígdala em todos os grupos de tratamento na necropsia. O grupo de controle rigoroso foi negativo para a *L. intracellularis* por IHC em todas as amostras de tecido tomadas na necropsia. A presença da *L. intracellularis* e lesões microscópicas associadas com a PPE foram encontradas nos íleos de 9/10 (90%) dos porcos dos controles de ataque não-vacinados, 6/15 (40%) dos porcos do grupo de baixa dose de vacina, 3/15 (20%) dos porcos do grupo de dose média de vacina e 1/15 (6,7%) dos porcos do grupo de dose alta de vacina, respectivamente. As lesões microscópicas foram evidentes no cólon de 8/10 (80%) dos porcos no grupo de controle de ataque, 3/15 (20%) dos porcos no grupo de dose baixa de vacina e de 1/15 (6,7%) dos porcos no grupo de dose alta de vacina. O grupo de vacina que recebeu uma dose média foi IHC negativo para a *L. intracellularis* no cólon. Seções manchadas do nodo linfático mesentérico produziram apenas 1/10 (10%) dos porcos no grupo de controle de ataque que apresentaram *L. intracellularis*. Os resultados de IHC positivo nas seções do íleo e cólon entre os grupos de tratamento se correlacionaram satisfatoriamente na presença de acentuada hiperplasia de folículo demonstrada pela metodologia de H&E.

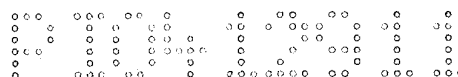
A análise estatística dos dados de IHC quantitativos foi conseguida usando os testes de ANOVA de 1 via e Soma de Kruskal-Wallis Rank, seguido de específicos valores de p contrários, entre o grupo de ataque e os grupos de controle rigoroso para cada grupo de dosagem de vacina. A análise estatística revelou evidência de um significativo desenvolvimento de lesão devido à *L. intracellularis* no íleo e cólon do grupo de controle de ataque, comparado aos porcos vacinados, desconsiderando-se a dose no dia 42 do estudo ($p < 0,001$). A significância estatística não foi evidente nas classificações médias de lesão de IHC do íleo e cólon nos animais vacinados que receberam uma dose alta ou média de vacina, comparado ao grupo de trata-

mento de controle rigoroso ($p > 0,05$). Os porcos que receberam uma dose baixa de vacina apresentaram classificações de lesão microscópica média significativamente superiores devido à *L. intracellularis* no íleo, comparado ao grupo de controle rigoroso ($p < 0,05$).

5 Marcações Graves

O íleo e cólon de cada animal de teste foram classificados no momento da necropsia (dia 42) quanto às lesões graves associadas com a PPE. Os tecidos dos porcos de teste no controle rigoroso foram normais, não continham lesões e receberam classificações de lesão médias de 1,1 (íleo) e 1,0 (cólon). Os tecidos dos animais de teste no grupo de controle de ataque não-vacinado receberam a mais alta classificação média de lesão grave para o íleo (3,6) e cólon (2,0) entre os grupos de tratamento. Os porcos de teste no grupo de baixa dose de vacina receberam classificações médias de lesões graves de 2,5 (íleo) e 1,5 (cólon). Os porcos de teste de dose média de vacina receberam classificações médias de lesão grave de 1,5 (íleo) e 1,0 (cólon). Os tecidos do grupo de dose alta de vacina receberam classificações médias de lesão grave de 1,5 (íleo) e 1,2 (cólon).

A análise estatística de classificações médias de lesão grave entre os grupos de tratamento foi conseguida mediante uso de ANOVA de 1 via. Uma classificação média de lesão grave indicou a evidência de uma significativa diferença entre íleos em grupo de controle de ataque não-vacinados e grupos de dose média e dose alta de vacina, respectivamente ($p < 0,001$). A evidência de uma significativa diferença foi observada entre as classificações médias de lesão grave do grupo de controle de ataque comparado ao grupo de dose baixa de vacina ($p < 0,01$). As classificações médias de lesão grave do cólon foram significativamente superiores no grupo de controle de ataque comparado aos grupos de dose média e alta de vacina, respectivamente ($p < 0,05$). Além disso, um significativo desenvolvimento de lesão grave foi observado no íleo do grupo de dose baixa de vacina, comparado ao grupo de controle rigoroso ($p < 0,001$). Nenhuma evidência de significativa estatística nas classificações médias de lesão grave (íleo e cólon) foi evidente nos grupos de média e alta dose de vacina, comparado ao grupo



de tratamento de controle rigoroso.

Conclusões

O presente estudo demonstrou que a proteção em porcos de 3 semanas de idade contra a PPE foi conseguida quando da oferta de uma dose de 2 mL oral de vacina B3903 (Liofilizada), contendo um mínimo de 4,9 logs de *L. intracellularis* viva por dose. Uma proteção similar, se não ligeiramente melhor, foi evidente no grupo de tratamento de dose alta de vacina que recebeu 6,0 logs/dose, 3 semanas antes do ataque. O grupo de dose baixa de vacina (3,8 logs/dose) não indicou adequada proteção contra um ataque heterólogo de uma cultura pura virulenta, comparado aos animais de teste que receberam uma dose alta ou média de vacina experimental. Diferenças estatísticas foram evidentes entre o grupo de baixa dose de vacina e os controles de ataque não-vacinados, considerando a gravidade das lesões microscópicas no íleo e cólon ($p < 0,001$) e as classificações médias de lesão grave do íleo ($p < 0,001$). Entretanto, significativas lesões de PPE foram observadas no íleo (lesões microscópicas) e cólon (lesões graves) desse grupo, comparado ao grupo de controle rigoroso que não recebeu vacina ou ataque.

Em resumo, os dados do presente estudo demonstraram que: (1) a titulação mínima protetora de uma única administração oral de vacina B3903 (Liofilizada) para porcos de 3 semanas de idade é de 4,9 logs/dose; (2) a vacina B3903 (Liofilizada) é eficaz contra uma cultura pura virulenta de baixa transferência do isolado heterólogo de *L. intracellularis* N101494; e (3) a vacina B3903 (Liofilizada) auxilia na redução de lesões graves e microscópicas, colonização de tecido e derramamento fecal de *L. intracellularis* em porcos vacinados, comparado a porcos não-vacinados.

REIVINDICAÇÕES

1. Vacina para imunização de um animal, caracterizada pelo fato de que compreende uma quantidade farmacologicamente eficaz de um isolado avirulento de *Lawsonia intracellularis*, que consiste no isolado avirulento de *Lawsonia intracellularis* de depósito ATCC N° PTA-4926, em que o referido isolado avirulento de *Lawsonia intracellularis* não causa vazamento fecal no 14º após a vacinação, e um veículo farmacologicamente aceitável.

2. Vacina de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a quantidade farmacologicamente eficaz do isolado avirulento de *Lawsonia intracellularis* é de 10^3 TCID₅₀ a 10^6 TCID₅₀ por dose.

3. Vacina para imunização de um animal, caracterizada pelo fato de que compreende o isolado avirulento de *Lawsonia intracellularis*, como definido na reivindicação 1, e um material antigênico de pelo menos um dentre os seguintes patógenos: *Salmonella* spp., *Erysipelothrix* spp., *Haemophilus* spp., *Mycolasma* spp., *Leptospira* spp., *Clostridium* spp., *Streptococcus* spp., *Brachyspira* spp., circovírus, vírus da síndrome reprodutora e respiratória de porco (PRRS), vírus da gripe suína (SIV), vírus da gastroenterite transmissível (TGE), parvovírus e *Escherichia coli*; e um veículo farmacologicamente aceitável.

4. Vacina para imunização de um animal, caracterizada pelo fato de que compreende o isolado avirulento de *Lawsonia intracellularis*, como definido na reivindicação 1, e um material antigênico de *Salmonella choleraesuis*, *Erysipelothrix* spp., vírus da gastroenterite transmissível (TGE), *Escherichia coli*, *Clostridium* spp., e *Brachyspira* spp.; e um veículo farmacologicamente aceitável.

5. Vacina para imunização de um animal, caracterizada pelo fato de que compreende o isolado avirulento de *Lawsonia intracellularis*, como definido na reivindicação 1, e um material antigênico de *Salmonella choleraesuis* e *Erysipelothrix* spp.; e um veículo farmacologicamente aceitável.

6. Vacina para imunização de um animal, caracterizada pelo fato

de que compreende o isolado avirulento de *Lawsonia intracellularis*, como definido na reivindicação 1, e um material antigênico de pelo menos um dentre os seguintes patógenos: *Clostridium* spp., vírus da gripe eqüina (EIV), vírus da herpes eqüina (EHV), alfavírus e vírus do oeste do Nilo (West Nile);
5 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

7. Método para fabricação de uma vacina para induzir uma resposta imune à bactéria *Lawsonia intracellularis* em um animal, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de: (a) incubar um isolado de *Lawsonia intracellularis*, como definido na reivindicação 1, em
10 células de cultura que estão em suspensão em uma concentração de oxigênio inferior a cerca de 10% para cultivar a referida bactéria; e (b) misturar a referida bactéria cultivada com um veículo farmacêuticamente aceitável.

8. Método de cultivo de *Lawsonia intracellularis*, como definido
15 na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que compreende:

(a) infectar células de cultura com um inóculo que compreende o isolado virulento de *Lawsonia intracellularis*, como definido na reivindicação 1;

(b) incubar as referidas células infectadas em uma concentração
20 de oxigênio inferior a cerca de 10%, ao mesmo tempo em que se mantém as referidas células infectadas em suspensão, mediante agitação das referidas células por um suficiente período de tempo para aumentar a produção da referida *Lawsonia intracellularis*, e

(c) colher pelo menos uma porção da referida *Lawsonia*
25 *intracellularis*.

9. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a concentração de oxigênio se situa na faixa de 0% a 8%.

10. Método de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que a concentração de oxigênio se situa na faixa de 0% a 3%.

30 11. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que a referida incubação ocorre em uma concentração de dióxido de carbono na faixa de 6% a 10%.

12. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que as referidas células cultivadas são selecionadas do grupo que consiste em: células HEp-2, McCoy e IEC-18.

5 13. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que as referidas células IEC-18 são cultivadas em microveículos.

14. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que as células infectadas são incubadas de acordo com a etapa (b) por um período de 2 a 10 dias.

10 15. Método de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que compreende ainda uma etapa (d) de liofilização da referida bactéria colhida.

16. Método de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de que a referida liofilização compreende uma etapa principal de secagem e uma etapa secundária de secagem.

15 17. Método para o diagnóstico de enteropatia proliferativa em porcos, caracterizado pelo fato de que compreende a execução de um ensaio para detectar anticorpos para a *Lawsonia intracellularis* em um sujeito animal não-humano, compreendendo:

20 (a) contatar uma amostra do sujeito com o isolado de *Lawsonia intracellularis*, como definido na reivindicação 1, para formar um complexo de antígeno-anticorpo; e

(b) detectar a formação do dito complexo, em que a presença do dito complexo se correlaciona positivamente com um diagnóstico de enteropatia proliferativa em porcos.

25 18. Método de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o ensaio compreende um ensaio selecionado do grupo que consiste em: rádio-imunoensaio, ensaio imunoabsorvente ligado à enzima, imunoensaio por fluorescência e ensaio de imuno-eletroforese.