



No. 15-303925- -00003-0000

Fecha: 2016-06-07 15:47:42 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 2 PATENTES Eve: 1 REGDEPOSITO
Act. 444 RESPUESTAREQUE Folios: 34

Bogotá D.C., 03 de Junio de 2016

DO

DIEB-489-2016

Señores

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

Delegatura para la Propiedad Industrial

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Carrera 13 no. 27-00

Bogotá.

Asunto: Radicado 15-303925

Respuesta al oficio No. 3370, notificado por fijación en lista el día 05 de Abril de 2016, a propósito de la solicitud de registro de la patente de invención "SUSTANCIA INHIBIDORA DE LA ADHESIÓN DE BACTERIAS QUE AFECTAN EL TRACTO RESPIRATORIO DE MAMÍFEROS"

Solicitante: Universidad Nacional de Colombia

Respuesta al examen de forma

LAURA MARCELA MANZANO JIMÉNEZ, mayor de edad y vecina de la ciudad de Bogotá, identificada tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderada de la UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA, me permito manifestar lo siguiente ante el oficio emanado de la Superintendencia de Industria y Comercio, dentro del plazo legal previsto en el artículo 39 de la Decisión 486, en los siguientes términos:

Modificación de una solicitud en trámite

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo documento descriptivo de la invención donde se realizaron los siguientes cambios:

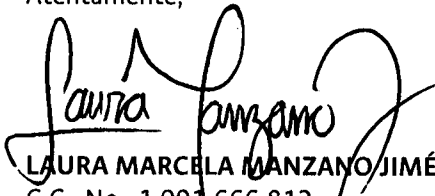
- **Petitorio (Art. 27 D 486).** Se reemplazó la palabra sustancia por el término glicoinhibidor, el cual caracteriza la función que cumple el producto o principio activo que impide la adherencia de las bacterias que afectan el tracto respiratorio de mamíferos. No se está reivindicando una composición específica, sólo una mezcla de azúcares que inhiben la adherencia de las bacterias al tracto respiratorio de mamíferos.
- **Descripción (Art. 28 D486).** Se modificó el capítulo descriptivo cambiando la palabra sustancia, en los lugares donde correspondía, por el término glicoinhibidor. No se reivindica una composición sino la mezcla de dos o más azúcares vegetales que conforman el principio activo para proteger el tracto respiratorio de los mamíferos y así preservarlos de enfermedades o infecciones causadas por bacterias que atacan por esa vía. Se reivindica un conjunto de azúcares que debidamente mezclados y en concentraciones entre 200 a 300 µg/kg constituyen el principio activo para impedir la adherencia de las bacterias.
- **Reivindicaciones (Art. 30 D486).** Las reivindicaciones se modificaron atendiendo las observaciones y ahora se ajustan a lo reglado por el artículo 30 de la Decisión 486.

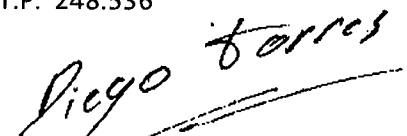
Por lo anterior, considero que el documento descriptivo modificado solventa las objeciones trasladadas y se cumple con el requisito de claridad de acuerdo con el artículo 30 de la Decisión 486, toda vez que el nuevo pliego es claro, conciso y está enteramente sustentado en la descripción. Por lo tanto, solicito respetuosamente continuar con el trámite y realizar la publicación de la solicitud.

Anexos

- Nuevo documento descriptivo de la invención.

Atentamente,


LAURA MARCELA MANZANO JIMÉNEZ
C.C. No. 1.091.666.812
T.P. 248.536


V.B. DIEGO ALEJANDRO TORRES GALINDO
Jefe
División de Extensión Sede Bogotá (DEB)

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación
---	---

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD DE PATENTE - NACIONAL

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad		
2	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		3	CIP Clasificación Internacional de Patentes
		GLICINHIBIDOR DE LA ADHESIÓN DE BACTERIAS QUE AFECTAN EL TRACTO RESPIRATORIO DE MAMÍFEROS		
4	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
Universidad Nacional de Colombia			899.999.063-3	5
5	DATOS DEL SOLICITANTE			
DIRECCIÓN		Cra 45 - 26-85, Edif. Uriel Gutierrez	No. TELÉFONO	3165068
CIUDAD		Bogotá	CORREO ELECTRÓNICO	gestionpi_bog@unal.edu.co
DEPARTAMENTO/ESTADO		Bogotá D.C.	NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Colombia
PAÍS DE RESIDENCIA		Colombia		
6	INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD	
1. Iregui Castro		Carlos Arturo	Colombiana	
2. María del Pilar		Patiño Horta	Colombiana	
3. Carolina		Gallego López	Colombiana	
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: <u>caireguic@unal.edu.co</u> ; <u>mdpatinoh@unal.edu.co</u> ; <u>carolinag150@gmail.com</u>				
7	DATOS INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria			
PAÍS RESIDENCIA		DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
1 Colombia		Bogotá DC	Bogotá	Carrera 45 N° 58 A - 75 Apto 502.
2 Colombia		Bogotá DC	Bogotá	Cra 28 -86 – 55, Int 4, Apto 404, Barrio El Polo
		Risaralda	Pereira	Carrera 28 N° 12-09, Edificio El Bosque, Apto 102. Barrio Los Alamos.
3 Colombia		Bogotá DC	Bogotá	Calle 25b N° 72-80, Int 1, Apto 205, Barrio Modelia.
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)				
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de información complementaria.				
8	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO			
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN	
Manzano Jiménez		Laura Marcela	C.C .1091666812 T.P .248536	
DIRECCIÓN		Av el Dorado # 44A-40		No. TELÉFONO 3165000 Ext 20064
CIUDAD		Bogotá		CORREO ELECTRÓNICO Immanzanoj@unal.edu.co
PAÍS		Colombia		No. RADICACIÓN O PROTOCOLO DE PODER GENERAL
9	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☐ SI ☒ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1.				
2.				
3.				

10	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado o número de registro.			
12	REDUCCIÓN DE TASAS		
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>			
☐ SI ☒ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☒			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 15 de anexos			
13	PARA PUBLICAR A PARTIR DE LA FECHA DE PRESENTACIÓN O DE LA PRIORIDAD INVOCADA:		14 COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO
Si es Patente de Invención ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☒ 18 meses ☐ Otro Cual:		Si es Patente de Modelo de Utilidad ☐ 6 meses ☐ 12 meses ☐ Otro Cual:	N° Fecha
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL <i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>		
16	ANEXOS		
Documentación Técnica ☒ Descripción N° de folios: 13 ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 5 ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 11 ☒ Resumen. 1. ☐ Documento de Prioridad. 2. ☐ Traducción del documento de prioridad. 3. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso. 4. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso. 5. ☐ Arte final 12 x 12. 6. ☐ Anexo formato digital.		Documentación Jurídica 11. ☒ Poderes, si fuera el caso. 12. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante. 13. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, si fuera el caso. 14. ☐ Copia de la licencia o autorización de conocimientos tradicionales, o Certificado o número de registro, si fuera el caso. 15. Reducción de tasas Micro, pequeñas o medianas empresas ☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea. ☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004. Universidades públicas o privadas ☒ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación Entidades sin ánimo de lucro ☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio. ☐ Hoja de información complementaria. ☐ Otros, especificar 16. ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud. 17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad. 18. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

GLICOLINHIBIDOR DE LA ADHESIÓN DE BACTERIAS QUE AFECTAN EL TRACTO RESPIRATORIO DE MAMÍFEROS

Sector tecnológico de la invención

La presente invención describe un glicoinhibidor compuesto por una mezcla de carbohidratos destinados a inhibir la adherencia de bacterias al epitelio del tracto respiratorio de mamíferos.

Técnica anterior

Las afecciones del tracto respiratorio son una de las principales causas de pérdidas económicas en los sistemas de producción animal, representadas por los costos de los tratamientos, la disminución de la producción y la mortalidad de los animales (Di Giacomo et al., 1991; USDA APHIS, 2000; Snowden, 2006; Brooks et al., 2011; USDA, 2011).

Dentro de la amplia variedad de microorganismos que afectan el sistema respiratorio de los animales, las bacterias juegan un papel importante en los procesos patológicos que se desarrollan en este sistema. Dentro de las bacterias Gram negativas, dos de ellas son aisladas de manera frecuente en la casuística de animales sometidos a producción: *Pasteurella multocida* y *Bordetella bronchiseptica*. Estas bacterias afectan una amplia variedad de especies animales, incluidos conejos, cerdos, bovinos, caninos y felinos (Deeb et al., 1990; Shina et al., 2002; Chalker et al., 2003; Aktories et al., 2012; Horiguchi, 2012). A pesar de que se les considera parte de la flora normal de las vías aéreas superiores de varios de estos animales, incluido el conejo, condiciones tales como el hacinamiento de los animales, los cambios de temperatura, de humedad, etc. parecen favorecer la proliferación exagerada de estos microorganismos, su diseminación y la expresión de sus factores de virulencia (Robertson et al., 1990; Aland and Madec, 2009).

Para el control de las enfermedades respiratorias causadas por bacterias en animales, se han empleado una variedad de tratamientos antibióticos que además de representar altos costos para el productor, han disminuido su efectividad debido al creciente desarrollo de resistencia contra estas sustancias lo cual es cierto para la mayoría de infecciones de origen bacteriano (Davies and Davies, 2010). Se ha observado resistencia de *P. multocida* a agentes antimicrobianos que incluyen penicilina, cloranfenicol, tetraciclinas y aminoglicósidos (Katsuda et al., 2013) y de *B. bronchiseptica* furazolidona, ampicilina, cefazolina, estreptomycin, amoxicilina/ácido clavulanico y tetraciclina (Zhao et al., 2011A) entre otros.

Con la intención de prevenir las infecciones por *P. multocida* se han utilizado vacunas (bacterinas), algunas de las cuales son elaboradas con bacterias inactivadas, a las que se les señalan problemas de reactividad debido probablemente al contenido de endotoxina; además, no proveen inmunidad de larga duración (Ataei et al., 2009); la baja capacidad inmunogénica podría deberse a la deficiente cantidad de anticuerpos opsonizantes puesto que dentro de las IgG inducidas por las proteínas de

membrana externa (rPmOmpA) no se encuentran anticuerpos con estas propiedades que favorezcan la fagocitosis de *P. multocida* por los neutrófilos (Dabo et al., 2008). Algunos autores reportan que, a pesar de que se da una respuesta inmune celular en las infecciones con *P. multocida*, la bacteria puede subvertir dicha respuesta induciendo apoptosis de las células inmunocompetentes (Praveena et al., 2010). Otros autores sostienen que la inmunidad protectora contra *P. multocida* es principalmente mediada humoralmente por anticuerpos contra el lipopolisacárido (LPS); sin embargo, a pesar de la disponibilidad de vacunas vivas y muertas para prevenir la infección por *P. multocida*, pocas ofrecen buenos niveles de protección dada la diversidad de LPS expresados por este microorganismo; esto hace necesario elucidar primero el rango completo de las estructuras expresadas por el LPS de *P. multocida* para poder entender el papel de esta molécula en la inmunidad protectora y así poder formular vacunas que ofrezcan protección cruzada y alta efectividad (Harper et al, 2013).

Contra *B. bronchiseptica* se han desarrollado numerosas vacunas con el fin de prevenir la infección con esta bacteria en diferentes especies animales, especialmente en cerdos, perros y gatos. Es así como hasta la actualidad se han elaborado vacunas a partir de la bacteria viva (Bey et al., 1981; Jacobs et al., 2005; Davis et al., 2007), de la bacteria muerta (Smith et al., 1982), de antígenos de superficie celular (Novotny et al., 1985; Jacobs et al., 1993), del lipopolisacárido (Novotny et al., 1985) y de la dermonecrotina (Kang et al., 2006). Sin embargo, a pesar de que los estudios experimentales con estas vacunas han mostrado resultados contradictorios (Ellis et al., 2002; Gopinathan et al., 2007; Mann et al., 2007; Davis et al., 2007), estudios recientes demuestran que las infecciones respiratorias en las que participa *B. bronchiseptica* siguen siendo un problema frecuente en animales de producción y de compañía (Zhao et al., 2011B; Schulz et al., 2014).

Con base en estos antecedentes, es necesario diseñar y desarrollar nuevas estrategias y sustancias para la prevención, tratamiento y control de las infecciones respiratorias, con un objetivo diferente al del ataque y la destrucción de la bacteria. Como cualquier otro patógeno, las bacterias que afectan el tracto respiratorio, se adhieren a las superficies mucosas del hospedero, y este proceso de adherencia es el primer paso en el desarrollo de una infección. Por lo tanto, la inhibición de la adhesión bacteriana resulta ser una buena alternativa como estrategia de prevención de la infección. Uno de los principales mecanismos por los cuales se da la primera interacción hospedero- patógeno es por medio del reconocimiento y unión del microorganismo a oligosacáridos específicos presentes en las superficies celulares del hospedero; en consecuencia, el uso de carbohidratos exógenos puede ser un mecanismo de bloqueo efectivo de la adherencia de las bacterias al epitelio. En términos ecológicos, el principio rector de esta aproximación es que el mecanismo de control propuesto para el patógeno, la inhibición de su adhesión, no agrede su integridad fisicoquímica de tal suerte que no se vea obligado a escalar sus mecanismos de patogenicidad, tal como sucede con las vacunas o antibióticos; pero de otro lado, al prevenir la adhesión del microorganismo así como el

2

6

6

uso de sustancias igualmente inocuas para el hospedero, se busca coadyuvar a que sea este último por sus propios medios -sistema mucociliar- el que se encargue de deshacerse de la bacteria lo menos traumáticamente para las dos partes.

Algunos autores han estudiado la inhibición de la adherencia de bacterias del género *Pasteurella* mediante el uso de carbohidratos: Glorioso *et al.* (1982) estudiaron la adhesión de *P. multocida* A aislada de conejos en monocapas de cultivos de células HeLa y células paraqueratóticas faríngeas, el hallazgo más significativo fue la inhibición de la adhesión de la bacteria a los dos tipos celulares mediante N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), lo que sugiere que existen receptores tipo lectinas sobre ambas superficies epiteliales que actúan como mediadores de la unión bacteriana a las células del hospedero. El papel adherente sobre la bacteria se le atribuye en buena medida a las fimbrias ya que en cepas con estas estructuras, la adhesión es mayor y su ausencia en la misma cepa demuestra poca o ninguna adhesividad (Ruffolo *et al.*, 1997); Jaramillo *et al.* (2000) describieron una proteína de 68 kD con propiedades de adhesina en *Mannheimia haemolytica* A1, esta adhesina fue inhibida mediante el uso de GlcNAc y ácido siálico (Neu5Ac) en células epiteliales de tráquea *in vitro*; Al-Haddawi *et al.* (2000) complementaron el anterior hallazgo al demostrar que la fimbria de *P. multocida* A3 aislada de conejos reconoce la GlcNAc en las cilias del epitelio respiratorio y a su vez reiteraron que con la utilización de este azúcar era posible bloquear tal unión por competencia; por otra parte, es posible que el ácido hialurónico presente en el serotipo capsular A de *P. multocida* contribuya a la unión de esta bacteria a lectinas propias del epitelio, (Pistole, 1981; Jacques *et al.*, 1987); Jacques *et al.* (1988) y Hatfaludi *et al.* (2010) sostienen que a pesar de que *P. multocida* posee diferentes estructuras que contribuyen a la unión a las células del epitelio respiratorio, el LPS y la fimbria tipo IV serían los principales mediadores de dicha adhesión actuando como ligandos carbohidrato (CHO) y lectina respectivamente.

A pesar de que *B. bronchiseptica* posee diferentes adhesinas en su superficie, los estudios, particularmente *in vivo* en terapia antiadhesiva basada en el uso de carbohidratos son prácticamente inexistentes. En el estudio de Plotkin and Bemis (1984), GlcNAc inhibió en un 100% la adherencia de *B. bronchiseptica* a fibroblastos de hámsteres (HLF), y reversaron en un 96% la adherencia de la bacteria a los HLF luego de 45 minutos de incubación. Investigaciones en *Bordetella pertussis*, afirman que la adherencia de la adhesina hemaglutinina filamentosa (FHA) de *B. pertussis* puede ser inhibida por moléculas que contienen lactosa como galactosa, galactosa B 1,4- glucosa y lactosaminas (Tuomanen *et al.*, 1988), mientras que Menozzi *et al.* (1994) proponen que esta inhibición se da únicamente por polisacáridos sulfatados como heparan sulfato y dextran sulfato. Aparte de la FHA existen otras adhesinas, como la fimbria y el LPS, que podrían mediar la adherencia de *B. bronchiseptica* a través de interacciones lectina-carbohidrato.

Otros estudios *in vitro* han investigado el efecto de glicoconjugados en la adherencia de *Pseudomonas aeruginosa* a células epiteliales del tracto respiratorio, entre ellos: la heparina, el dextrán y el dextrán sulfato en diferentes grados, bloquearon la adherencia de este microorganismo y algunos mono-, di- y tri-sacáridos de N acetil galactosamina (GalNAc) y galactosa (Gal) tales como GalNAc _ 1-4Gal, GalNAc _ 1-3Gal, Gal _ 1-4GlcNAc y Gal _ 1-3GlcNAc igualmente fueron buenos inhibidores de la adherencia de esta bacteria, de

Burkholderia cenocepacia y *Legionella pneumophila*. De manera similar, altas dosis de dextran administradas en aerosol inhibieron la infección con *P. aeruginosa* en un modelo en ratón (Bavington and Page, 2005).

La administración intratraqueal de oligosacáridos como lacto-*N*-neotetraose (LNnT) y sus α 2-3- y α 2-6-derivados sialilados, en modelos animales, atenuaron el curso de la neumonía por *Streptococcus pneumoniae* y previnieron la colonización de la nasofaringe con este patógeno; además, se disminuyó de manera drástica la colonización del pulmón y hubo protección contra la bacteremia. Los mismos carbohidratos disminuyeron la intensidad de la neumonía y la bacteremia cuando se administraron terapéuticamente 24 horas después de que la infección se hubiese establecido; administrados intranasalmente, estos neoglicoconjugados previnieron la colonización de la nasofaringe con *S. pneumoniae* en ratas infantiles (Idanpaan-Heikkila et al., 1997). La correlación parcial entre la bioactividad in vivo y la inhibición de la adherencia in vitro, sugiere que los oligosacáridos reducen la enfermedad por pneumococo, al menos en parte por interferencia con la adherencia de la bacteria a las células del hospedero. En este rol, los oligosacáridos presumiblemente actúan como homólogos receptores solubles que se unen a la bacteria, inhibiendo su subsecuente adherencia a las células del hospedero.

Es posible que estos oligosacáridos, en adición, favorezcan el barrido mucociliar del pneumococo, esto es sugerido por la disminución de pneumococos recuperados en el lavado broncoalveolar cuando dichas sustancias son aplicadas 24 horas antes de la bacteria; en cuyo caso indicaría que los oligosacáridos serían diluidos en el líquido periciliar, persistiendo en altas concentraciones en la delgada película húmeda de la interface epitelio-aire y, por lo tanto, bloqueen la adherencia aun muchas horas después de la administración (Idanpaan-Heikkila et al., 1997).

La mayoría de las patentes que sustentan invenciones dirigidas a prevenir la infección por *B. bronchiseptica* (WO1999059630; EP1667712; US20110059128; IL51537; US20130273100; US20130004510; US5985286; US4225583; US5595744; ZA2005/06073; CA2678698; US20100291104; US6387377) y por *P. multocida* (US20130004510; US5695769; EP2256185; US20080241192; WO2014083091; US20090068217; CA2148829; CA2729818; EP1638598; CA1328071; WO1994011024; WO2008153339; WO2007006101) tienen un concepto vacunal, donde se busca estimular la producción de anticuerpos y destruir los microorganismos. La presente invención por el contrario, busca prevenir la infección por medio del uso de carbohidratos de una manera ecológica, sin inducir daños ni una respuesta inmune en el hospedero y sin agredir a las bacterias.

La patente US8912314 (B2) hace referencia a una composición de un péptido con una secuencia específica de aminoácidos que se une selectivamente a poly- GlcNAc Staphylococcal (PNAG(dPNAG)) e induce un aumento en la opsonofagocitosis de las bacterias que expresan PNAG, entre ellas *B. bronchiseptica*. Esta patente se refiere a un péptido, no a un azúcar, y tiene como propósito inducir la destrucción bacteriana.

La solicitud patente EP0209493 hace referencia al bloqueo de la adhesión de las bacterias del género *Bordetella*, sin embargo, el método utiliza la producción de anticuerpos contra los glicoconjugados de la membrana celular de los mamíferos, es decir, es un método vacunal.

La patente AU2004212980 (B2) reclama un método para inhibir la adherencia de *P. multocida* entre otras bacterias, sin embargo, el método consiste en la elaboración de anticuerpos que se obtienen a partir de huevos de aves que fueron inoculadas previamente con el microorganismo.

La solicitud de patente WO2003002127 relaciona el uso de un inhibidor de glicosidasa que impide el desenmascaramiento de receptores glicano de un agente patógeno para el tratamiento de enfermedades causadas por diferentes bacterias, hongos, virus o toxinas. Sin embargo, esta patente, se refiere al uso de un inhibidor de la enzima glicosidasa, no al uso de carbohidratos para bloquear la adherencia bacteriana, además no incluye la prevención ni el tratamiento contra infecciones por *P. multocida* ni *B. bronchiseptica*.

Adicionalmente, la solicitud US 20090209486 A1 reclama una composición de uno o más carbohidratos entre los cuales se menciona a la GlcNAc, para diferentes usos incluyendo el tratamiento contra bacterias Gram negativas, el cual puede ser administrado por inhalación o por spray nasal. Sin embargo, la presente invención hace referencia a un glicoinhibidor de la adherencia de dos bacterias específicas del tracto respiratorio, la cual consiste en una mezcla de azúcares, dos de los cuales no están incluidos en la solicitud US 20090209486 A1, que se administra mediante un soporte con base en glicoconjugados aminoácido-carbohidrato.

Descripción breve de las figuras

Las Figuras 1 (*B. bronchiseptica*) y 2 (*P. multocida*) muestran el número de animales que presentaron signos clínicos en cada grupo experimental expuesto a cada bacteria.

Las Figuras 3 (*B. bronchiseptica*) y 4 (*P. multocida*) presentan la cantidad de conejos que tuvieron los diferentes patrones de neumonía en cada grupo experimental retado con cada bacteria.

Las Figuras 5 a 7 registran el grado de severidad de las lesiones microscópicas en septo nasal para *B. bronchiseptica* en los diferentes grupos experimentales.

En la Figura 8 se aprecia el grado de severidad de las lesiones microscópicas en septo nasal para *P. multocida* en los diferentes grupos experimentales.

Las Figuras 9 a 12 documentan el grado de severidad de las lesiones microscópicas en pulmón para *B. bronchiseptica* en los diferentes grupos experimentales.

En la Figura. 13 se observa el grado de severidad de las lesiones microscópicas en pulmón para *P. multocida* en los diferentes grupos experimentales.

5

9

9

En las Figuras 14 (*B. bronchiseptica*) y 15 (*P. multocida*) se compara el grado de severidad de las lesiones microscópicas en septo nasal entre los animales tratados con cada bacteria y los carbohidratos individuales frente a los animales tratados con cada bacteria y la mezcla de carbohidratos.

Las Figuras 16 (*B. bronchiseptica*) y 17 (*P. multocida*) comparan el grado de severidad de lesiones microscópicas en pulmón entre los animales tratados con cada bacteria y los carbohidratos individuales frente a los animales tratados con cada bacteria y la mezcla de carbohidratos.

Las Figuras 18 y 19 muestran la fotografía de pulmón de un conejo control positivo a la infección con *B. bronchiseptica* (Figura 18) y la de un conejo tratado con la mezcla de carbohidratos y *B. bronchiseptica* (Figura 19). H&E, 10X.

En las Figuras 20 y 21 se aprecian los pulmones de un conejo control positivo de *P. multocida* (Figura 20) y la de un conejo tratado con la mezcla de carbohidratos y *P. multocida* (Figura 21). H&E, 10X.

Descripción de la invención

Se presenta un glicoinhibidor de la adherencia de bacterias al tracto respiratorio de mamíferos. El glicoinhibidor de la adherencia está compuesto por una mezcla de carbohidratos.

Los carbohidratos de la mezcla mimetizarían diferentes receptores de las células epiteliales y/o adhesinas bacterianas bloqueando la adherencia de *B. bronchiseptica* y *P. multocida* al epitelio, lo que impide que se desarrolle la infección.

El término receptor celular se refiere a moléculas glicoprotéicas presentes en la superficie de las células del hospedero. El término adhesina, igualmente con propiedades glicoprotéicas, se refiere a moléculas de adhesión bacteriana.

Las bacterias que afectan el tracto respiratorio se unen a oligosacáridos específicos presentes en la superficie del epitelio. Por otro lado, la bacteria posee estructuras glicosiladas en su superficie, las cuales son reconocidas por lecti

nas propias del epitelio. Los carbohidratos mimetizan los receptores glicosilados de las células epiteliales y/o las adhesinas bacterianas y ocupan su contraparte respectivamente, inhibiendo de esta manera la adherencia de la bacteria a la superficie del tracto respiratorio.

Los carbohidratos componentes de las mezclas son derivados de la glucosa (Glc) y de la manosa (Man).

6

10

10

Para determinar los carbohidratos que componen la mezcla anti-adhesiva para cada bacteria se deben seguir los siguientes pasos:

1. Para determinar los posibles carbohidratos a los que se une la bacteria, se hacen ensayos *in vitro* en cultivos de septo nasal de feto de conejo donde se evalúa la inhibición de la adhesión de cada bacteria al epitelio respiratorio con 18 lectinas diferentes. Por medio de la técnica de inmunohistoquímica se determina el porcentaje de adherencia de las bacterias al epitelio y por medio de hematoxilina-eosina (H&E) se evalúan las lesiones y el grado en que son inhibidas por las lectinas que resultan efectivas frente a los controles positivos y frente a otras lectinas que no sean efectivas.
2. Basados en los resultados del punto anterior, se hacen ensayos *in vitro*, igualmente en cultivos de septo nasal de feto de conejo, donde se determina la dosis mínima efectiva para lograr la inhibición de la adhesión de cada bacteria y las lesiones al epitelio respiratorio, con los carbohidratos, que son reconocidos de manera específica por las lectinas inhibidoras de la adhesión bacteriana. Por medio de la técnica de inmunohistoquímica, se detecta el porcentaje de inhibición de adherencia de las bacterias al epitelio. Adicionalmente, por H&E se hace una evaluación del grado de inhibición de las lesiones microscópicas.
3. Se desarrollan ensayos *in vivo* en conejos de 51 días de edad, donde de igual manera se evalúa la inhibición de la adhesión de cada bacteria al epitelio del tracto respiratorio con los carbohidratos y la dosis establecidos en el punto anterior. Se examinan los conejos para valorar la manifestación o no de signos clínicos, las lesiones macro y microscópicas en septo nasal y pulmón según el caso; en adición, se detecta la presencia o ausencia de las bacterias en los pulmones por medio de aislamiento microbiológico y por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) convencional.
4. Basados en los resultados del punto anterior, se determina cuáles son los carbohidratos, que inhiben los signos clínicos, las lesiones macroscópicas y microscópicas y la presencia de la bacteria en pulmón.
5. Se elabora una mezcla con los carbohidratos que demuestren el mayor efecto inhibitorio, según el punto anterior, y se hacen ensayos *in vivo* similares a los descritos en el punto 3, evaluando la manifestación o no de signos clínicos, la presencia de lesiones macro y microscópicas, y la detección de las bacterias por aislamiento microbiológico y por PCR convencional. Adicionalmente se determina el porcentaje de adherencia de las bacterias al epitelio por medio de la técnica de inmunohistoquímica. Se establece la dosis óptima que inhibe la adherencia de cada bacteria y las lesiones microscópicas en el epitelio entre 200 - 300 µg/kg.

7

+

6. Formas de aplicación: La vía de administración de la mezcla inhibidora de la adhesión de bacterias que afectan el tracto respiratorio de mamíferos es nasal, por lo tanto puede ser administrada de manera tópica directamente en la fosa nasal o por aspersión. Adicionalmente, los carbohidratos pueden ir unidos a moléculas que le confieran mayor estabilidad y que permiten suministrar la mezcla a partir de soportes con base glicoconjugados aminoácido-carbohidrato.

Mejor manera de realizar la invención

La invención se ilustra con los siguientes ejemplos:

EJEMPLO 1: Cepas bacterianas

P. multocida y *B. bronchiseptica* fueron obtenidas a partir de septo nasal, tráquea o pulmón de conejos enfermos con rinitis y bronconeumonía de forma natural. Para la identificación de la bacteria se realizaron test microbiológicos de rutina, amplificación por PCR y posterior secuenciación. Con el fin de aumentar o activar la virulencia de los aislamientos bacterianos, se inocularon ratones por vía intraperitoneal con cada bacteria, los cuales luego de mostrar los primeros signos de enfermedad, fueron sacrificados y se reaislaron las bacterias a partir de sus tejidos.

EJEMPLO 2: Lectinas

Se utilizaron un total de 18 lectinas de tres kits comerciales. Estas lectinas son extraídas de diferentes plantas y fueron seleccionadas con base en un rango de especificidad hacia diferentes azúcares.

Las lectinas evaluadas y su especificidad se presentan a continuación:

Source of lectin			Carbohidrate
Abbreviation	Latin name	Common name	Specificity
Con A	<i>Canavaliaensiformis</i>	Jack bean	Man / Glc
DBA	<i>Dolichosbiflorus</i>	Horse gram	GalNAc(α1-3) / GalNAc
DSL	<i>Daturastramonium</i>	Jimson weed or thorn Apple	(GlcNAc)2-4
ECL	<i>Erythrinacristagalli</i>	Coral tree	Gal / GalNAc
GSL I	<i>Griffoniasimplicifolia I</i>	Unknown	Gal / GalNAc
GSL II	<i>Griffoniasimplicifolia II</i>	Unknown	GlcNAc
JACALINA	<i>Artocarpusintegrifolia</i>	Jack fruit	Gal / GalNAc

Source of lectin			Carbohidrate
Abbreviation	Latin name	Common name	Specificity
LCA	<i>Lens culinaris</i>	<i>Lentil</i>	Man / Glc
LEL	<i>Lycopersiconesculenum</i>	<i>Tomato</i>	(GlcNAc)2-4
PNA	<i>Arachishypogaea</i>	<i>Peanut</i>	Gal β 1-3/ GalNAc1
PSA	<i>Pisum sativa</i>	<i>Garden pea</i>	Man / Glc
RCA ₁₂₀	<i>Ricinuscommunis</i>	<i>Castor oil bean</i>	Gal β 1-4 /GalNAc
SBA	<i>Glycine max</i>	<i>Soybean</i>	Gal / GalNAc
SJA	<i>Sophora japonica</i>	<i>Japanese pagoda tree</i>	Gal / GalNAc
STL	<i>Solanumtuberosum</i>	<i>Potato</i>	(GlcNAc)2-4
UEA I	<i>Ulexeuropaeus I</i>	<i>Gorze or furze</i>	Fucosa (Fuc)
VVA	<i>Viciavillosa</i>	<i>Hair vetch</i>	GalNAc
WGA	<i>Triticum vulgaris</i>	<i>Wheat germ</i>	GlcNAc& Neu5Ac

EJEMPLO 3: Ensayos *in vitro* con lectinas para determinar los azúcares a ensayar

Se utilizaron secciones de septo nasal de feto de conejo. Para evaluar el efecto inhibitorio de las lectinas sobre la adhesión de las bacterias al epitelio respiratorio, se incubó 0,1- 0,3 µg/ml de cada lectina con el tejido de septo nasal sumergido en Medio esencial enriquecido con glucosa (MEM) durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda con 5% de CO₂, posteriormente se hicieron tres lavados con MEM para eliminar la lectina no adherente, se adicionaron 10⁷ UFC de cada bacteria y se incubó durante 2 horas más. Se incluyeron también controles negativos, controles positivos (bacteria sola) y controles de cada lectina. Los tejidos fueron fijados en formalina bufferada al 3,7% durante 24h.

Los tejidos fueron evaluados por la técnica de inmunoperoxidasa indirecta (IIP) para determinar la cantidad de bacteria adherida al borde ciliado de las células epiteliales respiratorias. Se utilizó un antisuero policlonal obtenido en oveja como anticuerpo primario contra cada bacteria, y como anticuerpo secundario se empleó un antisuero IgG comercial contra oveja producido en burro. La cantidad de bacteria adherida al epitelio fue evaluada por un score cuantitativo, de la siguiente manera: ausencia de bacterias adheridas 0%; bacterias adheridas al 33% de la superficie epitelial, bacterias adheridas al 66% de la superficie y al 99% de la superficie.

Las lectinas que mostraron un efecto inhibitorio significativo de la adherencia de las bacterias al compararlo con el control positivo, fueron LCA (*Lens culinaris*), PNA (*Arachishypogaea*), WGA (Wheatgermagglutinin- *Triticum vulgaris*), RCA₁₂₀ (*Ricinuscommunis*) y DBA (*Dolichosbiflorus*). Con base en este resultado se eligieron los azúcares GlcNAc, GalNAc, alfa metil manósido (AmeMan), alfa metil glucósido (AmeGlc) y ácido sialico (Neu5AC) para evaluar su efecto inhibitorio sobre la adherencia bacteriana.

EJEMPLO 4: Ensayos *in vitro* para la determinación de la dosis mínima efectiva de los azúcares

Se utilizaron secciones de septo nasal de feto de conejo en cultivo. Para determinar la dosis mínima efectiva de los azúcares para la inhibición de la adhesión de las bacterias al epitelio respiratorio, se evaluaron las diferentes dosis entre el rango de 50-400 µg. Se incubaron los tejidos con 10⁷ UFC de cada bacteria con cada azúcar a las diferentes dosis, sumergidos en MEM durante 2 horas a 37°C en cámara húmeda con 5% de CO₂. Se incluyeron también controles negativos y controles positivos. Los tejidos fueron fijados en formalina bufferada al 3,7% durante 24h. Los tejidos fueron evaluados por la técnica de inmunoperoxidasa indirecta (IIP) para determinar la cantidad de bacteria adherida al borde ciliado de las células epiteliales respiratorias, los parámetros de evaluación de la adherencia están descritos en el ejemplo 3. Adicionalmente se hizo una evaluación de las lesiones microscópicas. Estos tejidos fueron procesados por la técnica de rutina con tinción de hematoxilina-eosina (H&E). La dosis que inhibió la adherencia de cada bacteria y las lesiones microscópicas en el epitelio estuvo entre 200 - 300 µg.

EJEMPLO 5: Ensayos *in vivo* para evaluar el efecto inhibitorio de los azúcares sobre la adherencia de las bacterias

Se utilizaron conejos Nueva Zelanda blancos de 51 días de edad se distribuyeron al azar en 12 grupos de tratamiento (tres conejos por grupo) los cuales incluían un grupo por cada azúcar más bacteria, un grupo control de cada azúcar, un grupo control positivo y un grupo control negativo. Para la preparación de la solución experimental se mezclaron 1x10⁷UFC de cada bacteria con 200-300 µg de cada azúcar o de la mezcla de azúcares que habían dado resultados significativos; la solución se incubó a temperatura ambiente. Posteriormente los animales fueron instilados con la solución tratamiento, por la vía intranasal (IN) y por la vía intratraqueal (IT). Los gazapos fueron evaluados clínicamente cada 4 horas post instilación. A las 72 horas post instilación los conejos fueron sacrificados, previa anestesia.

Luego del sacrificio de los animales, se llevó a cabo la necropsia. Se retiró la caja torácica, se separó todo el sistema respiratorio desde la laringe y se infundió formaldehído al 3,7% vía traqueal con una columna de 20cm de presión de agua. Se evaluaron macroscópicamente los pulmones y se determinaron patrones neumónicos desarrollados para el caso de cada bacteria. Se tomaron muestras de los cornetes y de los pulmones para ser procesados por la técnica de rutina con tinción de hematoxilina-eosina (H&E), para ser posteriormente evaluados por microscopía de luz. Y se

tomaron nuevas muestras de pulmón para detectar la presencia de las bacterias por microbiología y por PCR.

EJEMPLO 6: Determinación de los azúcares que tienen un efecto bloqueador significativo de la adherencia de las bacterias

Basados en los resultados de la evaluación clínica de los animales, de la detección de las bacterias por aislamiento microbiológico y por PCR y de las evaluaciones macro y microscópica de los tejidos, se determinaron cuáles azúcares presentan un mayor efecto inhibidor de la adherencia para cada bacteria

B. bronchiseptica:

Ninguno de los animales tratados con *B. bronchiseptica* más GlcNAc o AmeGlc presentó signos clínicos. Por otro lado, al menos dos de tres conejos tratados con *B. bronchiseptica* y GalNAc, AmeMan o Neu5AC presentaron signos clínicos, un animal tratado con *B. bronchiseptica* y AmeMan murió a causa de la infección (fig. 1). Los animales del grupo control positivo (*B. bronchiseptica*) evidenciaron una mayor severidad de los signos clínicos, dos de los tres animales murieron alrededor de las 24 horas post inoculación. Ningún animal de los grupos control de carbohidratos, ni del grupo control negativo, presentaron signos clínicos.

Por medio de aislamiento microbiológico y PCR convencional se detectó la presencia de *B. bronchiseptica* únicamente en los pulmones de los mismos grupos de animales que presentaron signos clínicos.

Los tres conejos tratados con *B. bronchiseptica* mas GlcNAc mostraron pulmones de apariencia normal, y solo un animal del grupo tratado con *B. bronchiseptica* mas AmeGlc presentó un patrón de neumonía. En el resto de grupos, incluidos aquellos del grupo control positivo, al menos dos conejos presentaron algún tipo de patrón de lesión pulmonar. Ninguno de los animales control negativo, ni controles de carbohidratos presentaron lesión pulmonar (fig. 3).

Para aquellos animales tratados con *B. bronchiseptica* más carbohidratos, únicamente los de los grupos *B. bronchiseptica*+ GlcNAc y *B. bronchiseptica*+ AMetGlc mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) en la severidad de todas las lesiones microscópicas en pulmón (fig. 9 a 12) y en septo nasal (fig. 5 a 7) frente a aquellos del grupo control positivo (fig. 18).

Se determinó que los azúcares GlcNAc y AMetGlc tienen un mayor potencial inhibidor de los efectos causados por la infección por *B. bronchiseptica* y por lo tanto son bloqueadores efectivos de la adhesión de la bacteria al epitelio.

P. multocida:

Los animales control negativo y control de azúcares no presentaron signos clínicos compatibles con enfermedad, así como tampoco los animales tratados con GlcNAc, AMetGlc y AmeMan. Los animales control positivo y los animales que recibieron tratamiento con GalNAc y Neu5AC presentaron sintomatología (fig. 2).

Se logró realizar reaislamiento bacteriano a partir de los animales control positivo y de los animales tratados con GalNAc y Neu5AC.

Macroscópicamente los animales control positivo y los animales tratados con GalNAc y Neu5AC presentaron algún patrón morfológico de neumonía, mientras que los otros grupos experimentales no presentaron cambios morfológicos macroscópicos (fig. 4).

Los cambios microscópicos en septo nasal se presentaron con menor severidad en los animales tratados con GlcNAc, AMetGlc y AmeMan ($p < 0.05$). Los animales control positivo y los tratados con GalNAc y Neu5AC fueron los que mas lesiones evidenciaron (fig. 8).

Los cambios microscópicos en pulmón se presentaron con menor frecuencia y severidad en los animales tratados con GlcNAc, AMetGlc y AmeMan ($p < 0.05$). Los animales control positivo (fig. 20) y los tratados con GalNAc y Neu5AC fueron los que mas lesiones evidenciaron (Figura 13).

EJEMPLO 7: Ensayos *in vivo* para evaluar el efecto inhibitorio de la mezcla de azúcares sobre la adherencia de las bacterias

Se elabora una mezcla con los carbohidratos que presentaron el mayor efecto inhibitorio, según el ejemplo anterior, y se hacen ensayos *in vivo* similares a los descritos en el ejemplo 5, donde se incluye un grupo tratado con cada bacteria más la mezcla de carbohidratos y un grupo control de la mezcla de carbohidratos. Adicionalmente se determinó el porcentaje de adherencia de las bacterias al epitelio por medio de la técnica de inmunohistoquímica (IIP).

B. bronchiseptica:

La mezcla glicoinhibidora de la adherencia para esta bacteria contiene GlcNAc y AMetGlc.

Ninguno de los animales tratados con *B. bronchiseptica* más la mezcla de carbohidratos manifestó signos clínicos.

No se reaisló *B. bronchiseptica* de ningún pulmón de los conejos tratados con *B. bronchiseptica* más la mezcla de carbohidratos.

A la necropsia todos los conejos tratados con *B. bronchiseptica* más la mezcla de carbohidratos presentaron pulmones de apariencia normal.

A la evaluación microscópica se encontró una disminución significativa ($p < 0.05$) en la severidad de engrosamiento de septos y presencia de detritus en la luz bronquiolar en pulmón (fig. 16 y 19) y de pérdida de cilias en septo nasal (fig. 14) frente a aquellos animales tratados con los azúcares

individuales.

De acuerdo con la técnica de IIP, tanto para cornete nasal como para pulmón, no hubo marcación en los animales tratados con *B. bronchiseptica* más la mezcla de carbohidratos y hubo una marcación moderada en los animales control positivo.

P. multocida:

De acuerdo con los resultados en los experimentos que evaluaban el efecto de carbohidratos individuales sobre la adherencia de *P. multocida* al epitelio respiratorio, se decidió hacer una mezcla con aquellos que inhibieron significativamente los signos clínicos y las lesiones macro y microscópicas los cuales fueron GlcNAc, AMetGlc y AmeMan.

Este experimento demostró que el tratamiento en animales inoculados con *P. multocida* más la mezcla de carbohidratos disminuye aún más la presentación de signos clínicos, el reaislamiento microbiológico y la expresión de cambios macros y microscópicos ($p < 0.05$) (fig. 15, 17 y 21).

De acuerdo con la técnica de IIP hubo una marcación leve a moderada en los animales control positivo; los animales retados con *P. multocida* más la mezcla de carbohidratos no mostraron marcación alguna en pulmones y solo fue leve en cornetes nasales.

Reivindicaciones

1. Un glicoinhibidor de la adherencia de bacterias que afectan el tracto respiratorio de mamíferos CARACTERIZADO PORQUE comprende dos o más de los siguientes carbohidratos: N- acetil glucosamina (30% - 50%), Alfa metil glucósido (30% - 50%), Alfa metilmanósido (30% - 50%).
2. El glicoinhibidor de la adherencia de bacterias que afectan el tracto respiratorio de mamíferos de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE comprende la mezcla N- acetil glucosamina y Alfa metil glucósido, bloqueante de *B. bronchiseptica*.
3. El glicoinhibidor de la adherencia de bacterias que afectan el tracto respiratorio de mamíferos de la reivindicación 1, CARACTERIZADO PORQUE comprende la mezcla N- acetil glucosamina, Alfa metil glucósido y Alfa metilmanósido, bloqueante de *P. multocida*.
4. El glicoinhibidor de la adherencia de bacterias que afectan el tracto respiratorio de mamíferos de las reivindicaciones 2 y 3, CARACTERIZADO PORQUE la mezcla de carbohidratos va en una cantidad entre 200 y 300 µg/kg.
5. El glicoinhibidor de la adherencia de bacterias que afectan el tracto respiratorio de mamíferos de la reivindicación 1, CARACTERIZADA PORQUE se presenta en un soporte con base en glicoconjugados aminoácido-carbohidrato.

ANEXOS

Figura 1

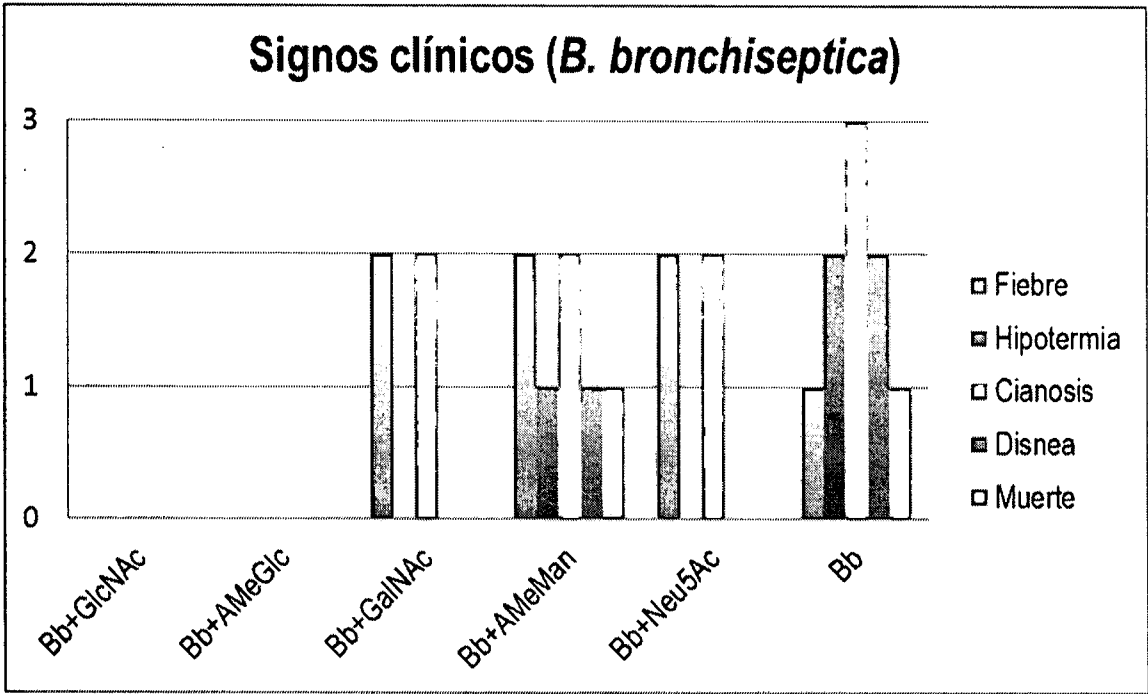


Figura 2

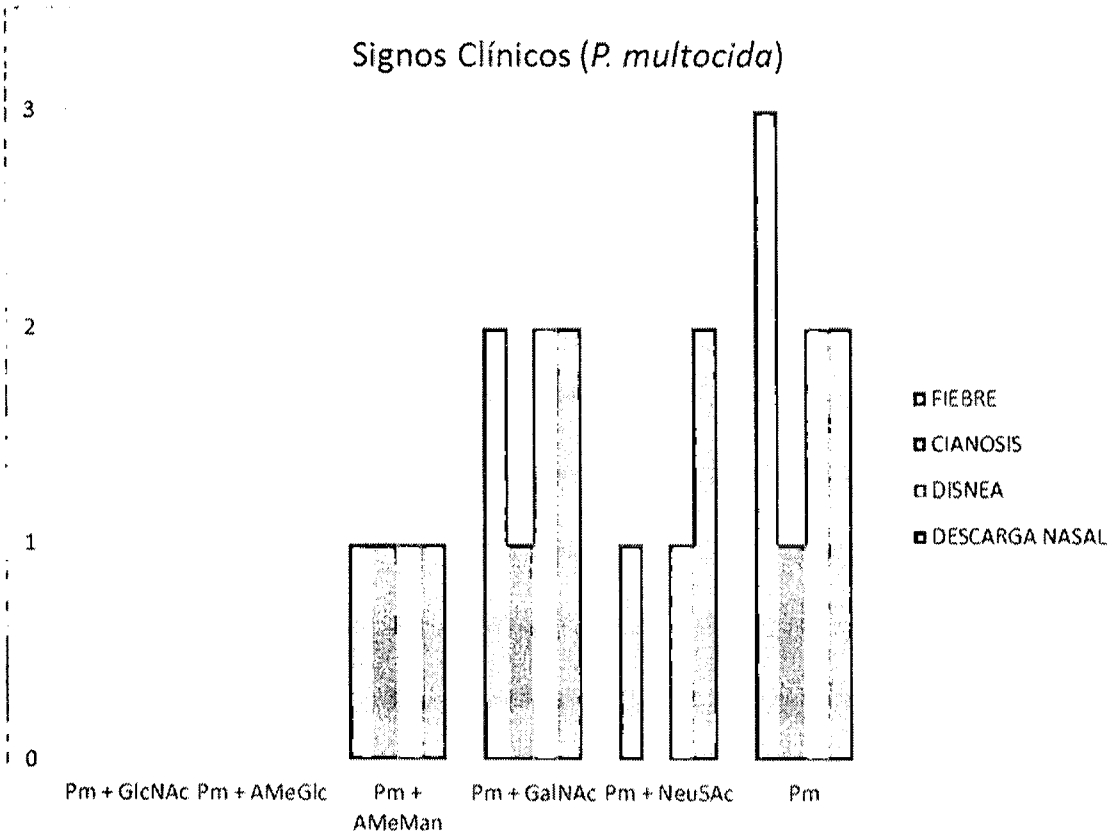


Figura 3

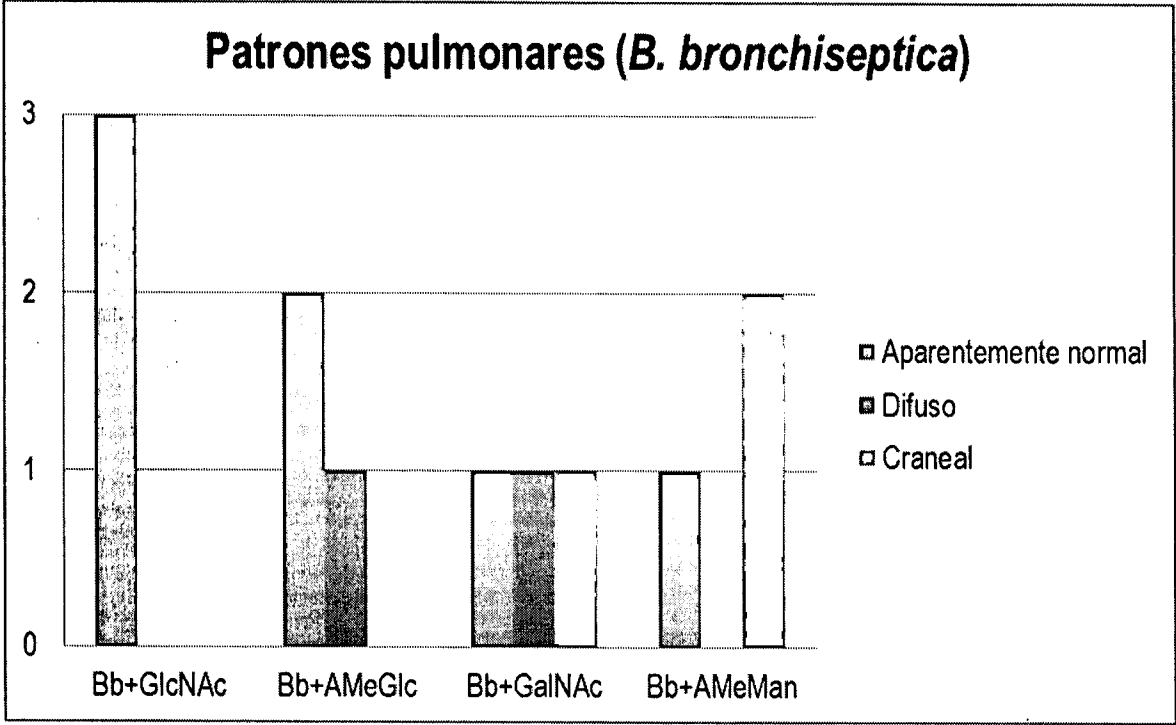


Figura 4

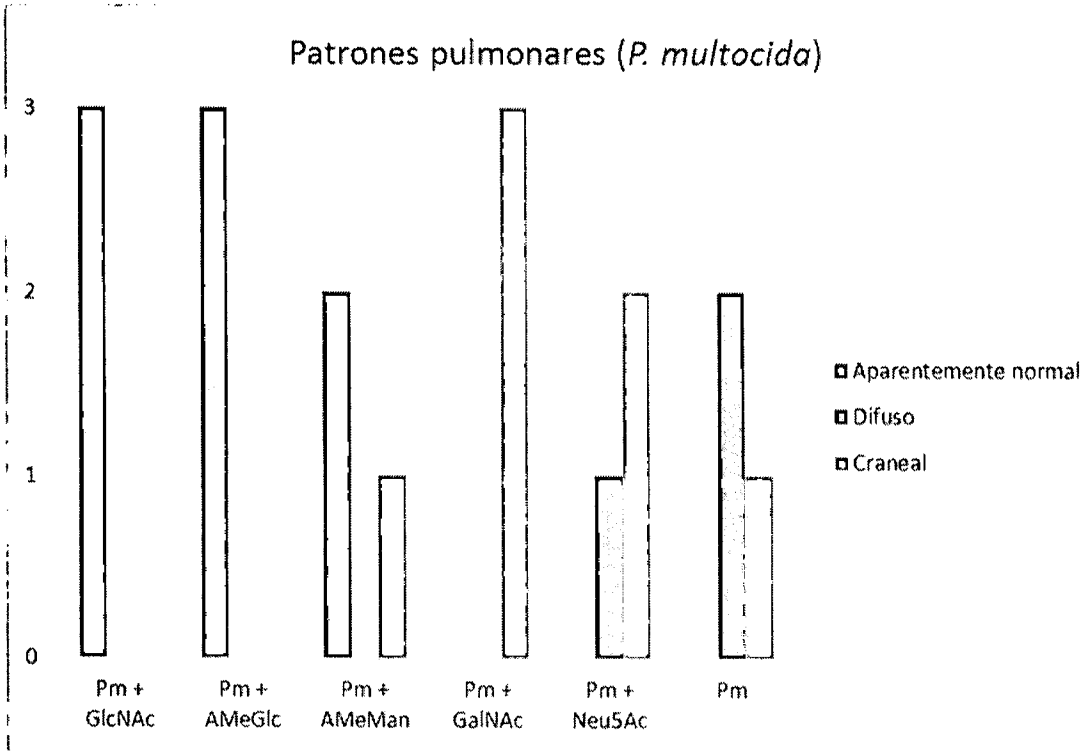


Figura 5

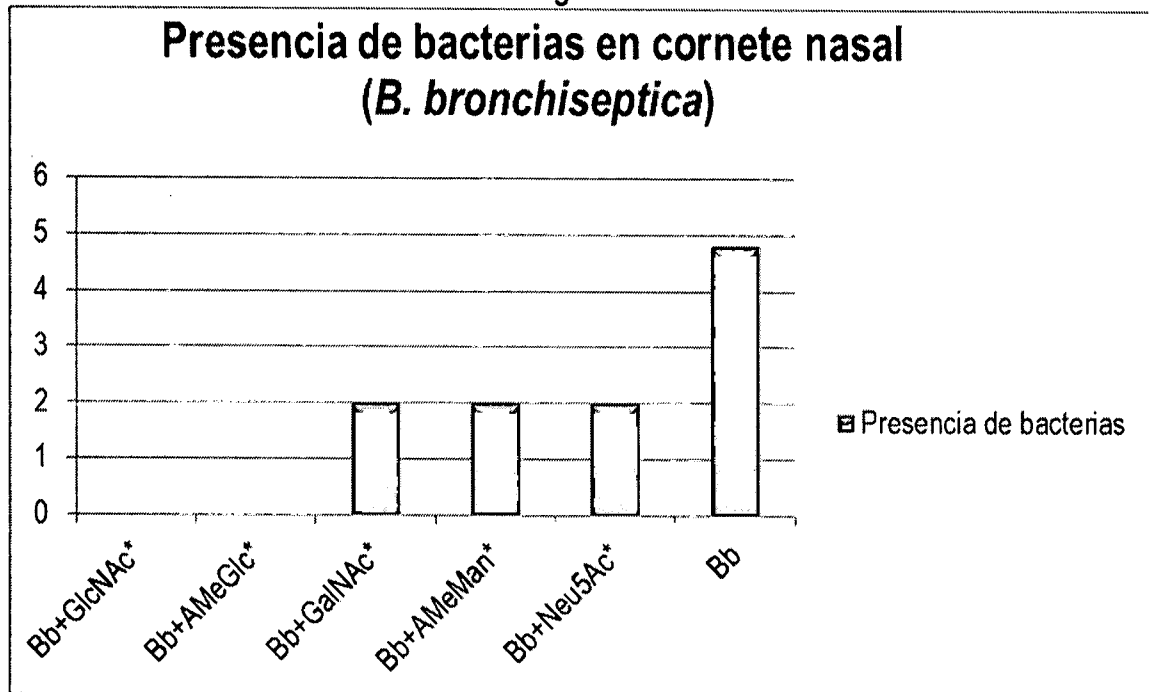


Figura 6

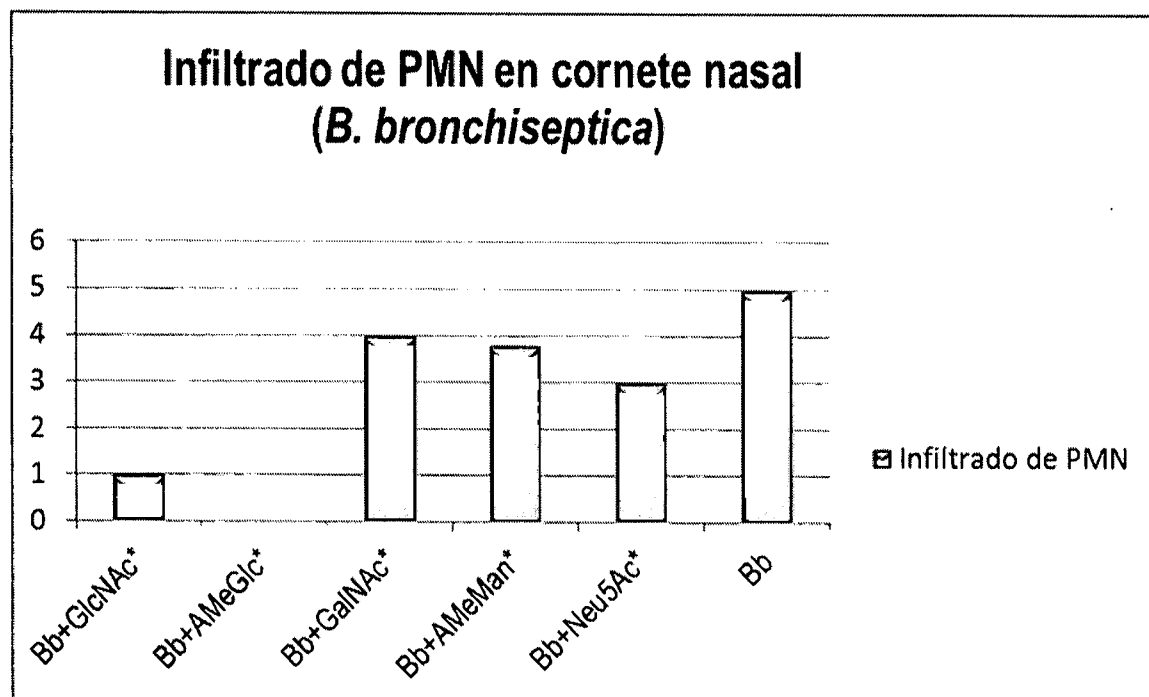


Figura 7

47

21

21

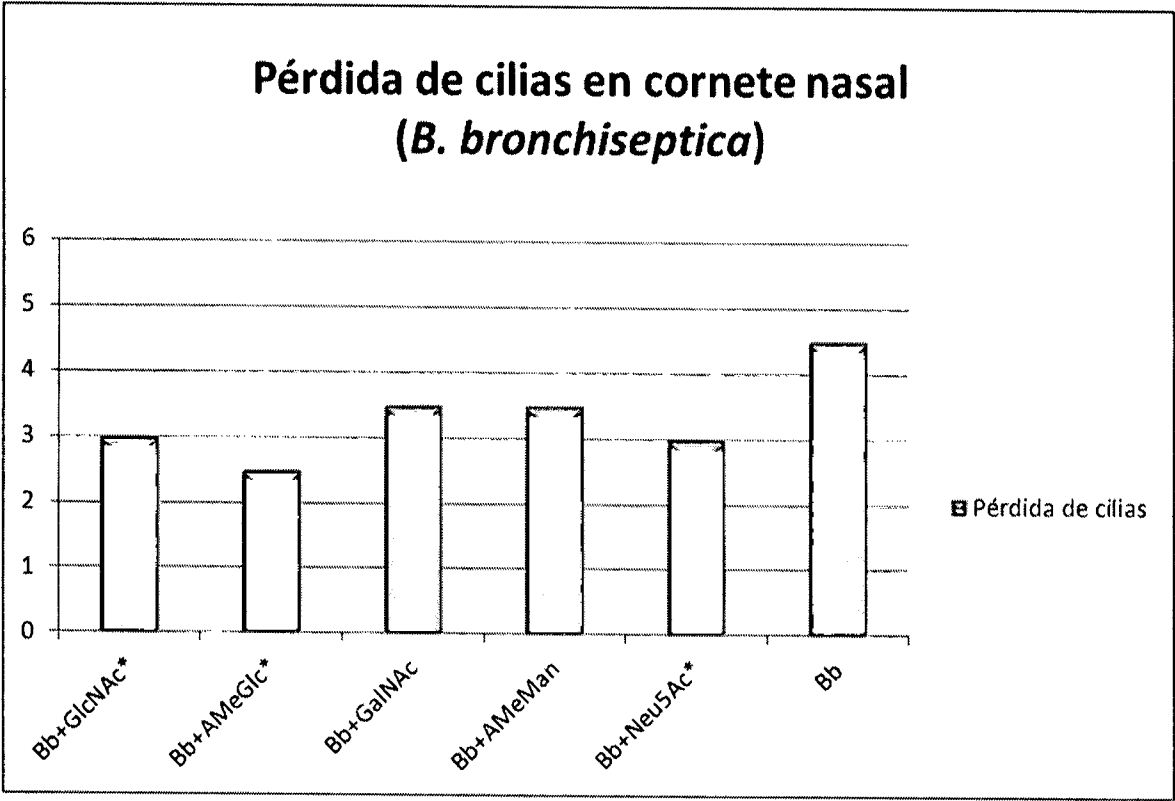


Figura 8

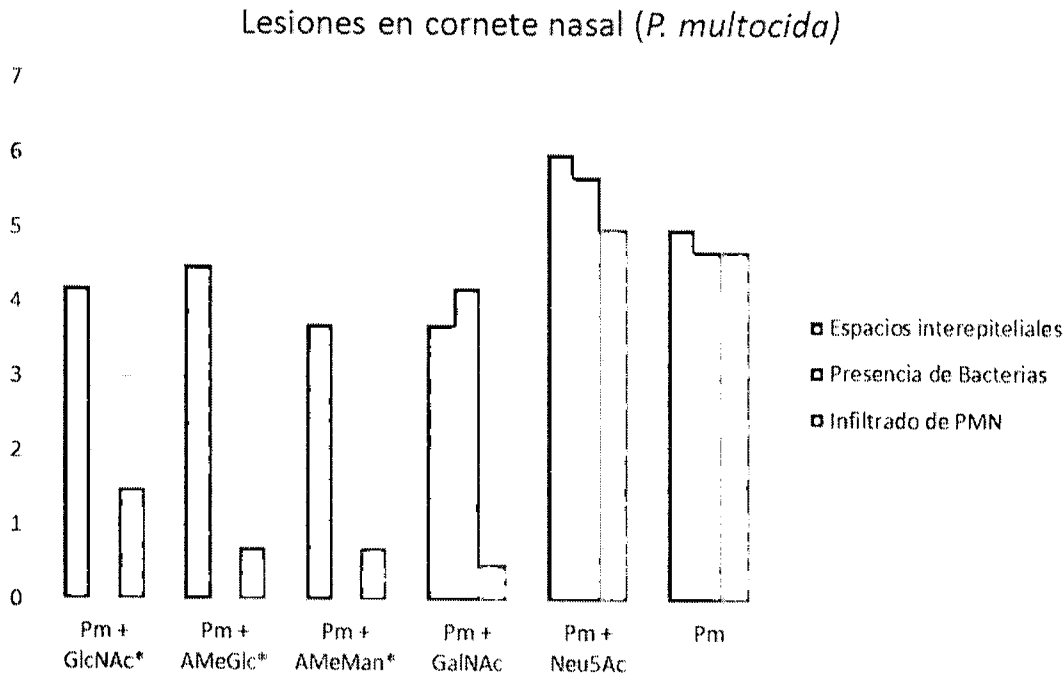


Figura 9

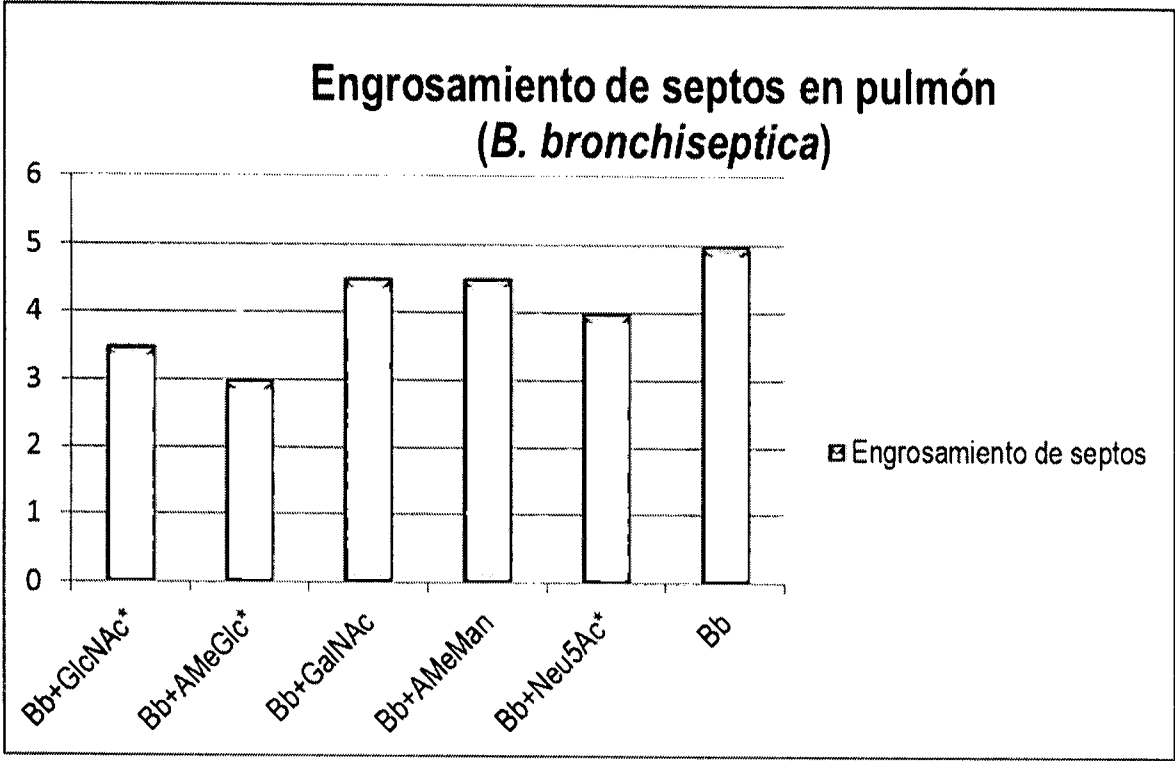


Figura 10

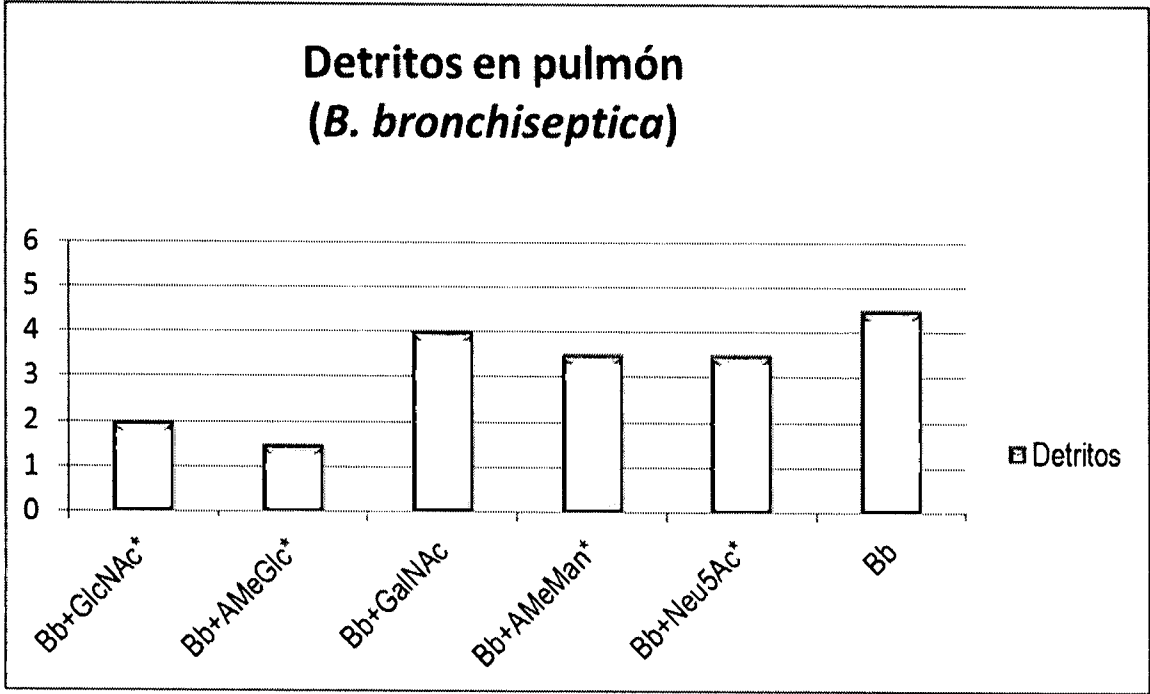


Figura 11

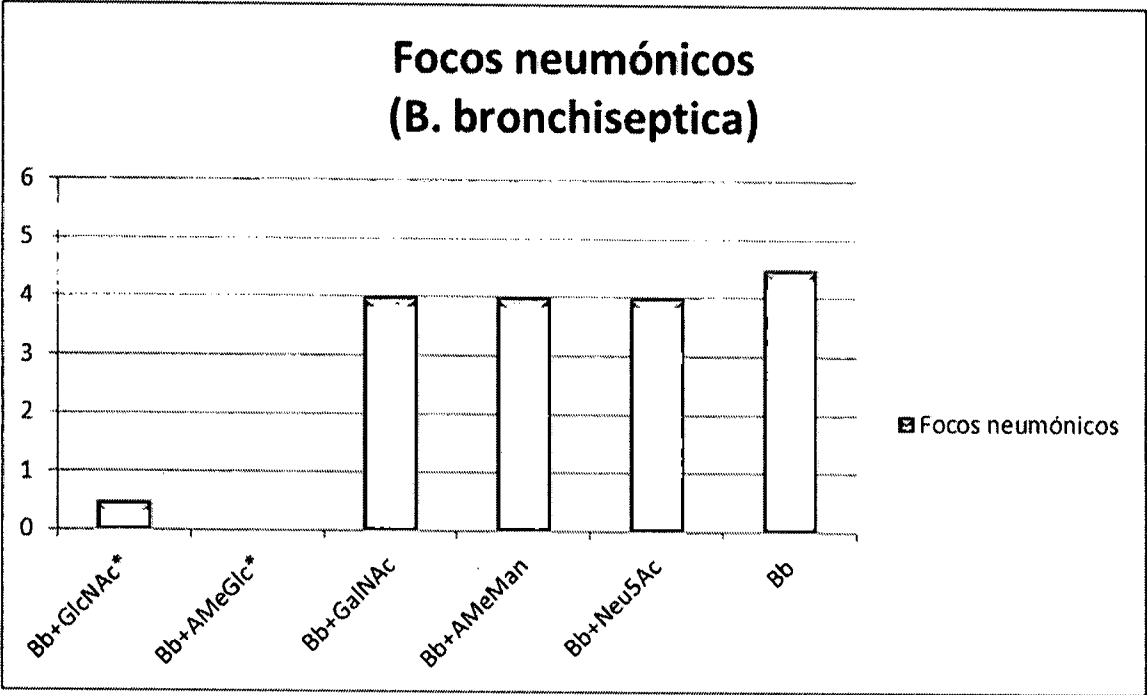


Figura 12

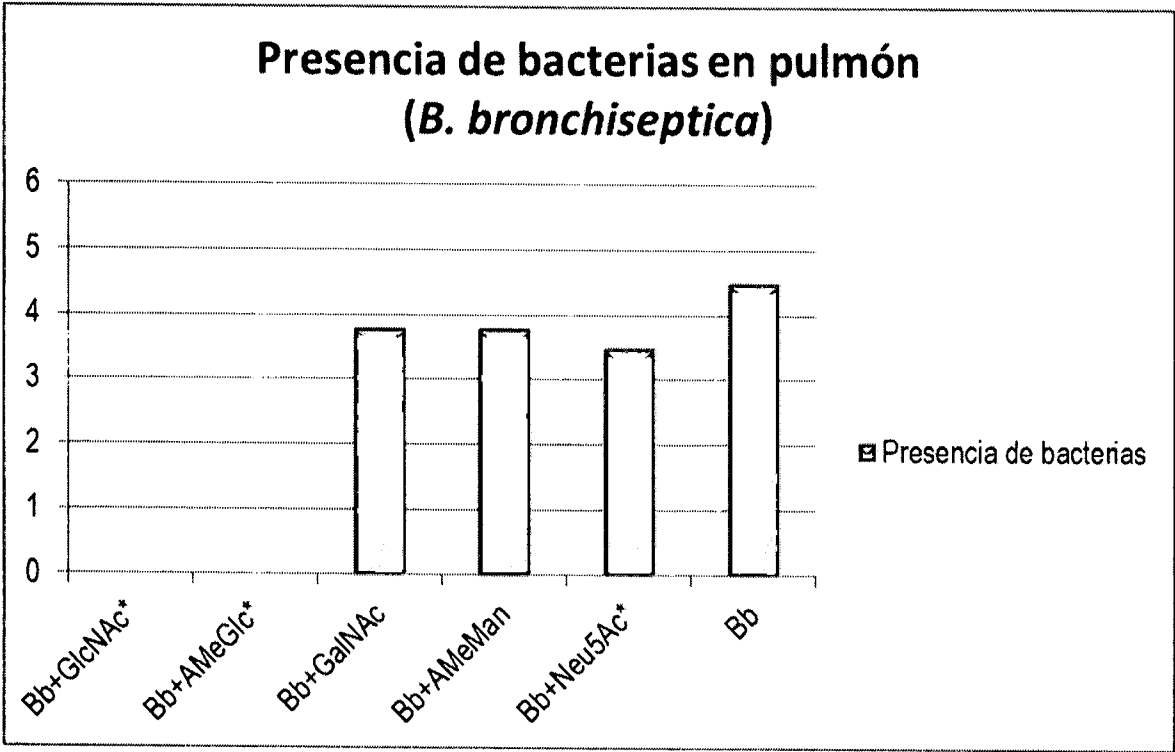


Figura 13

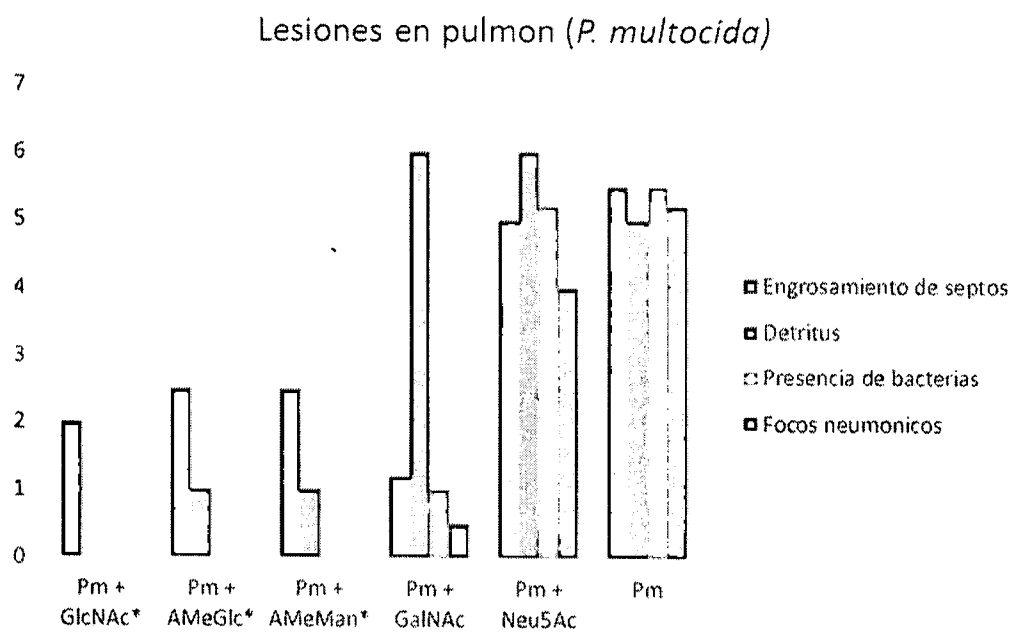


Figura 14

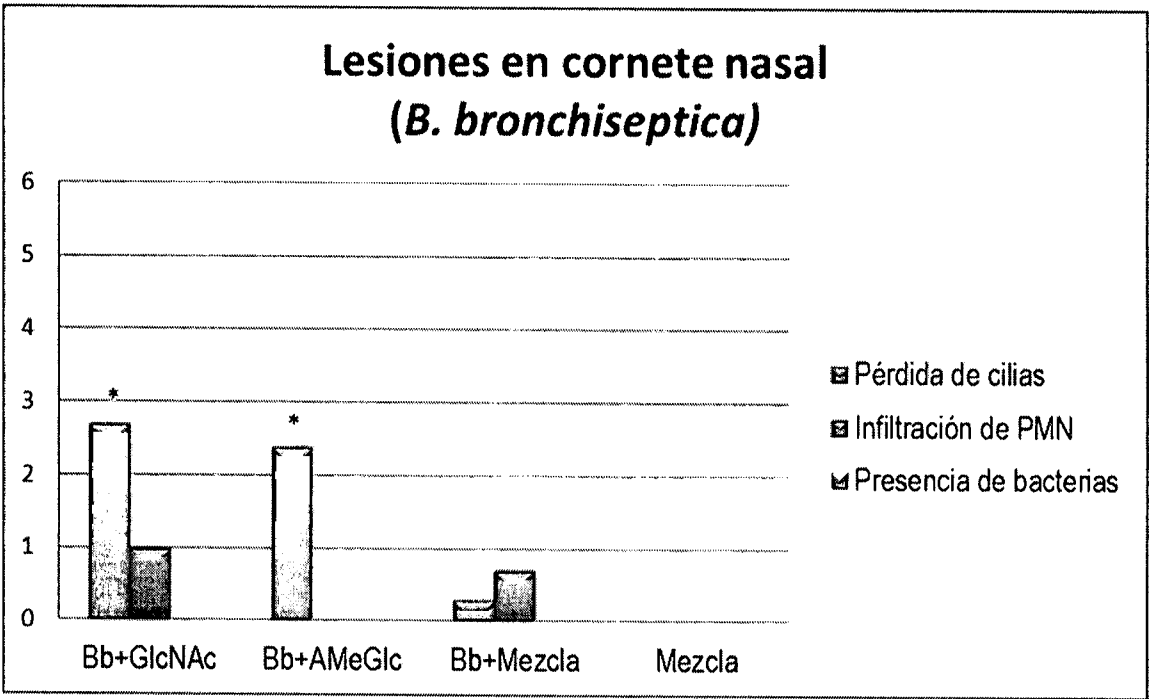


Figura 15

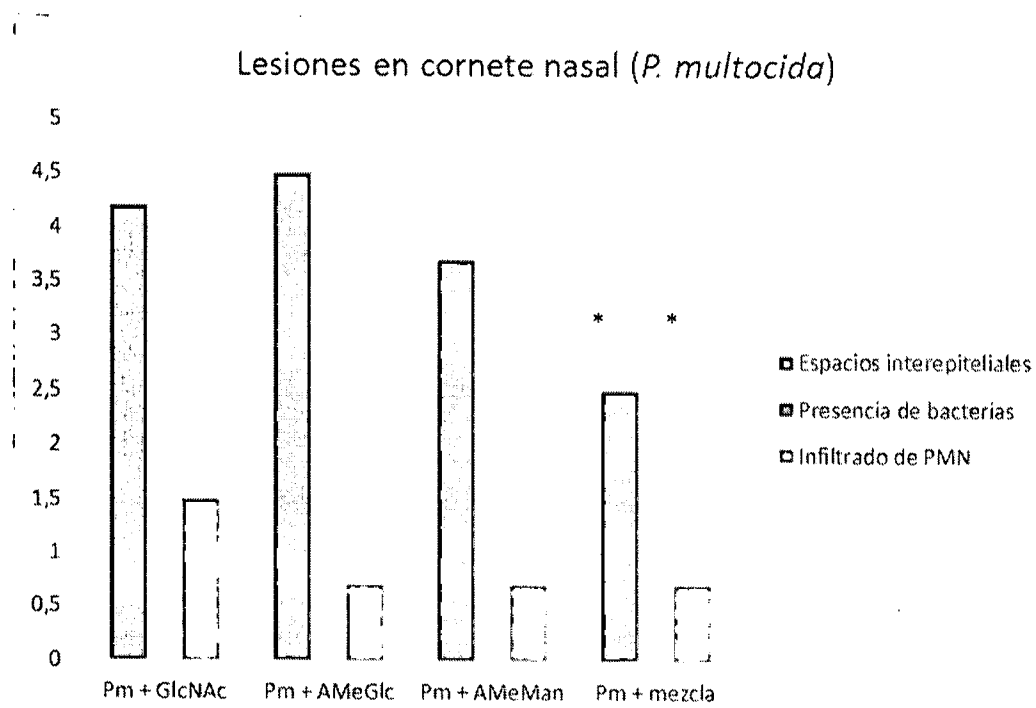


Figura 16

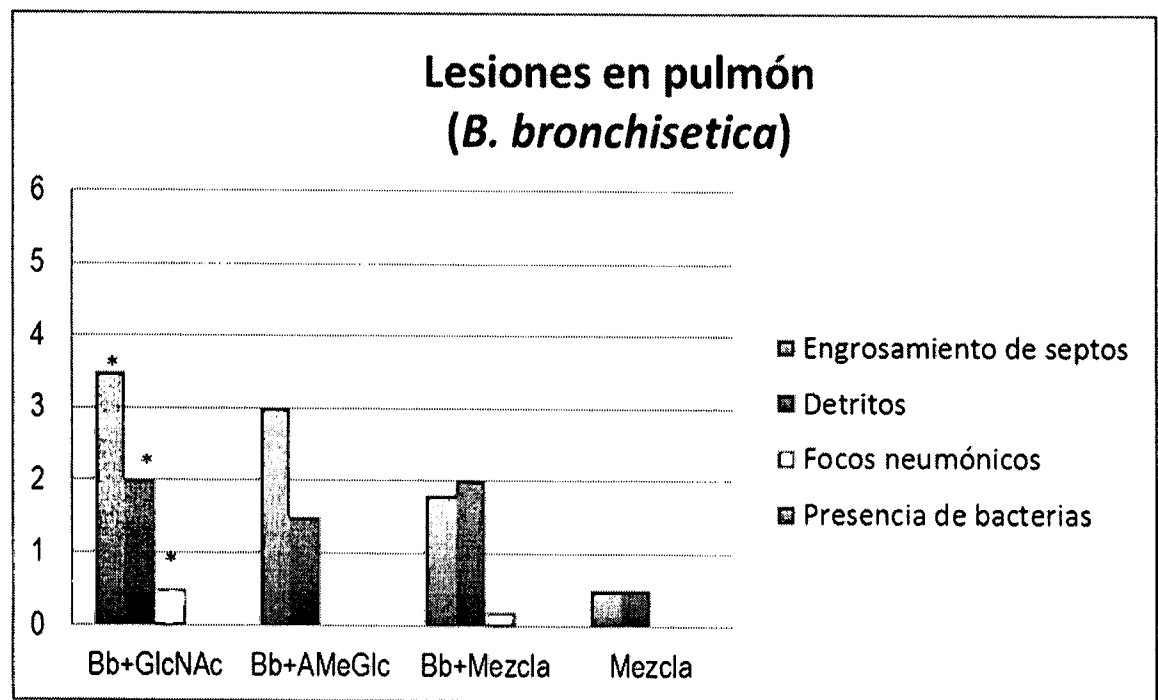


Figura 17

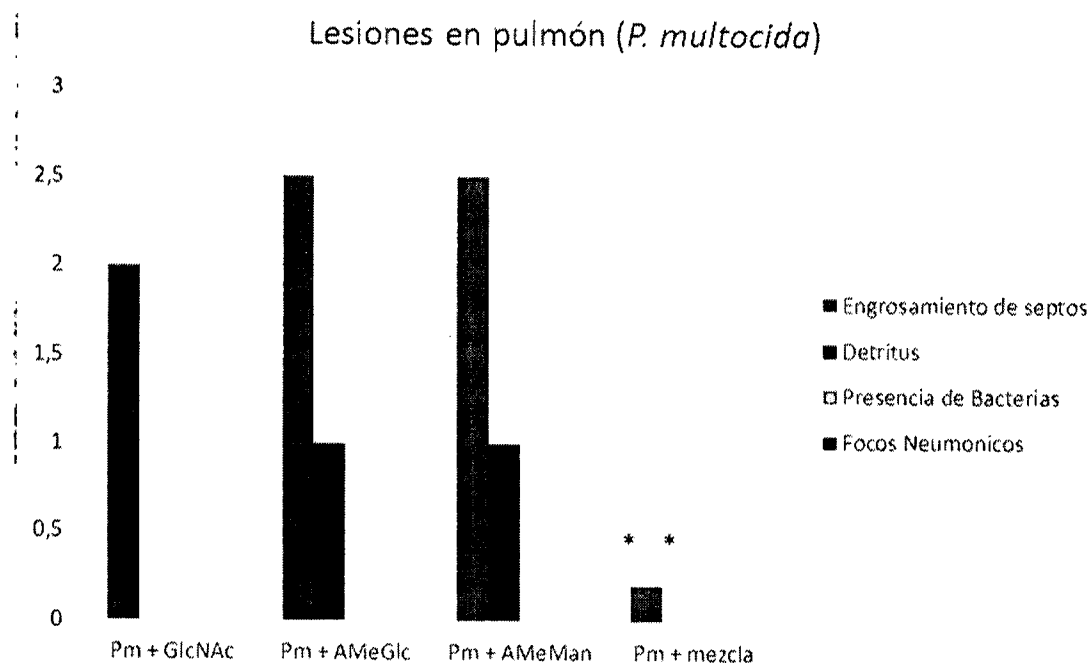


Figura 18

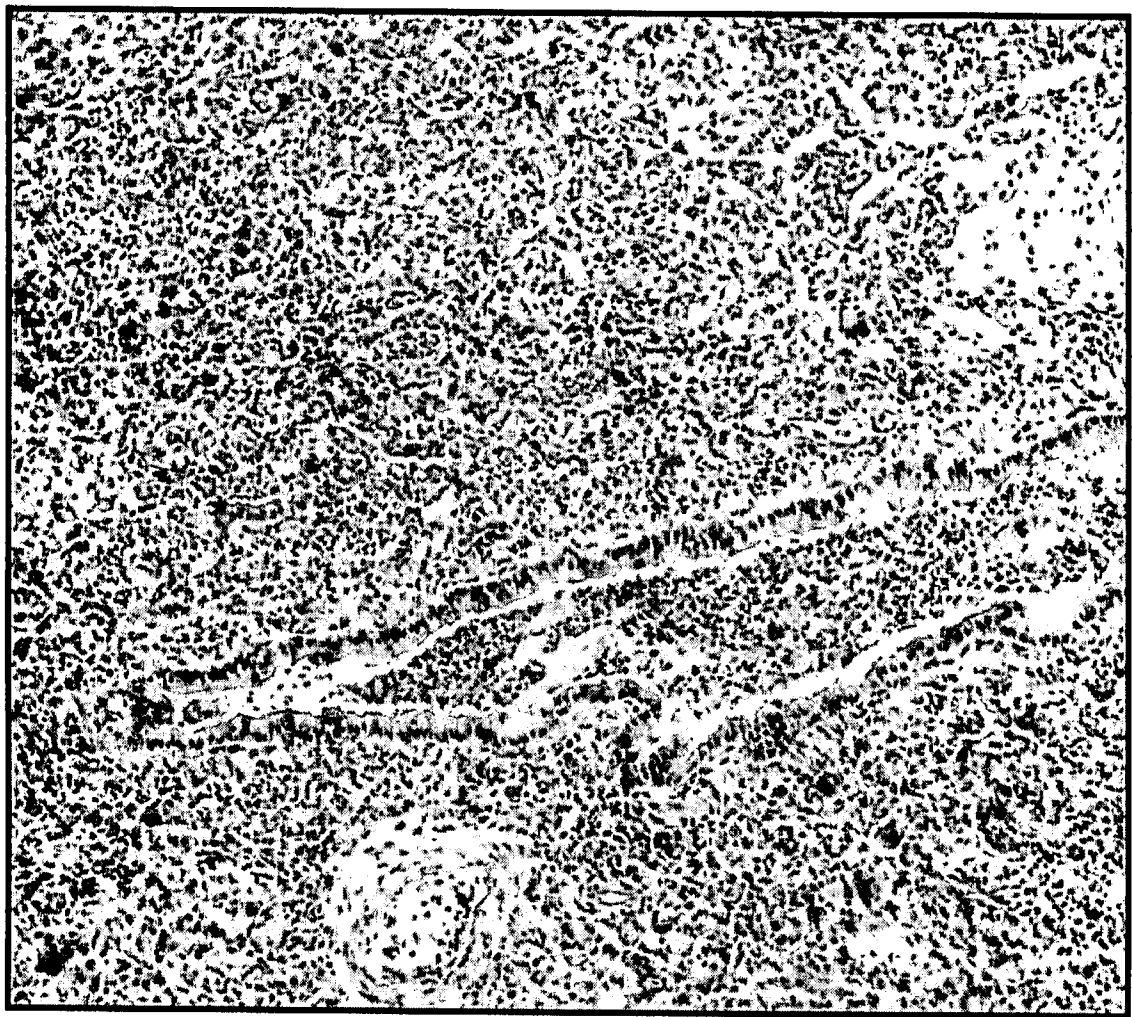


Figura 19

23
27
27

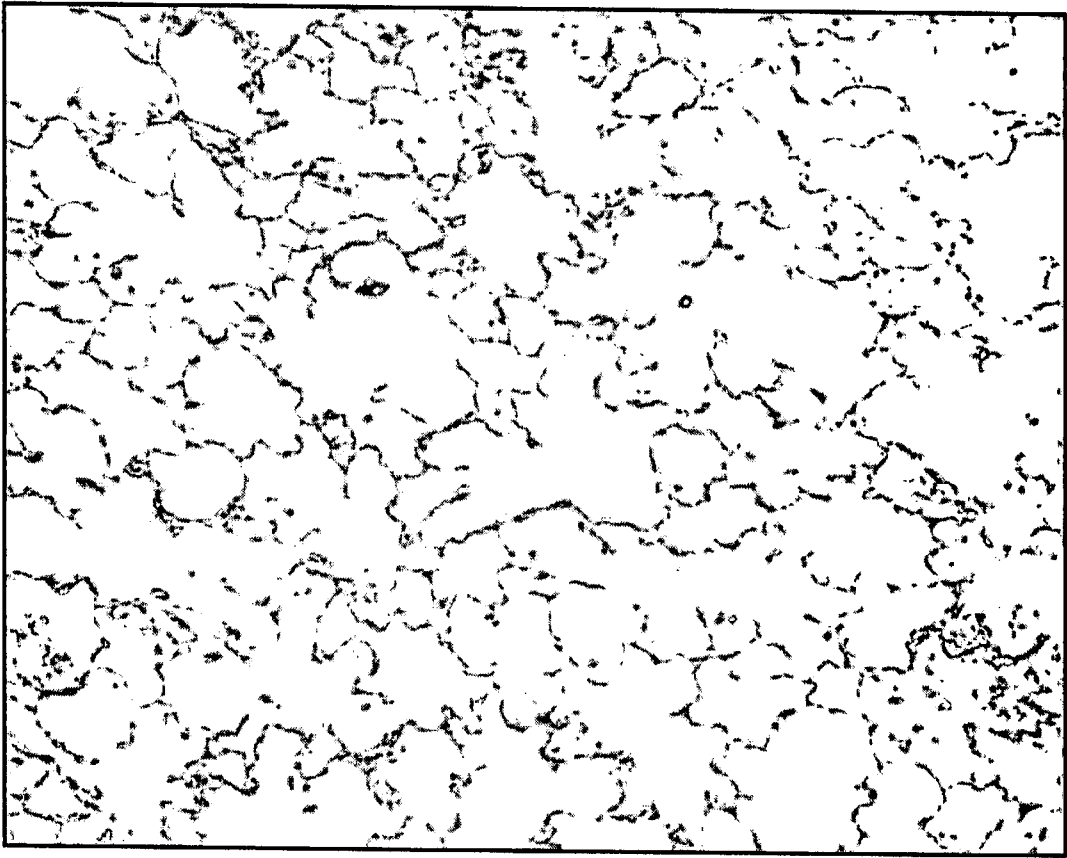


Figura 20

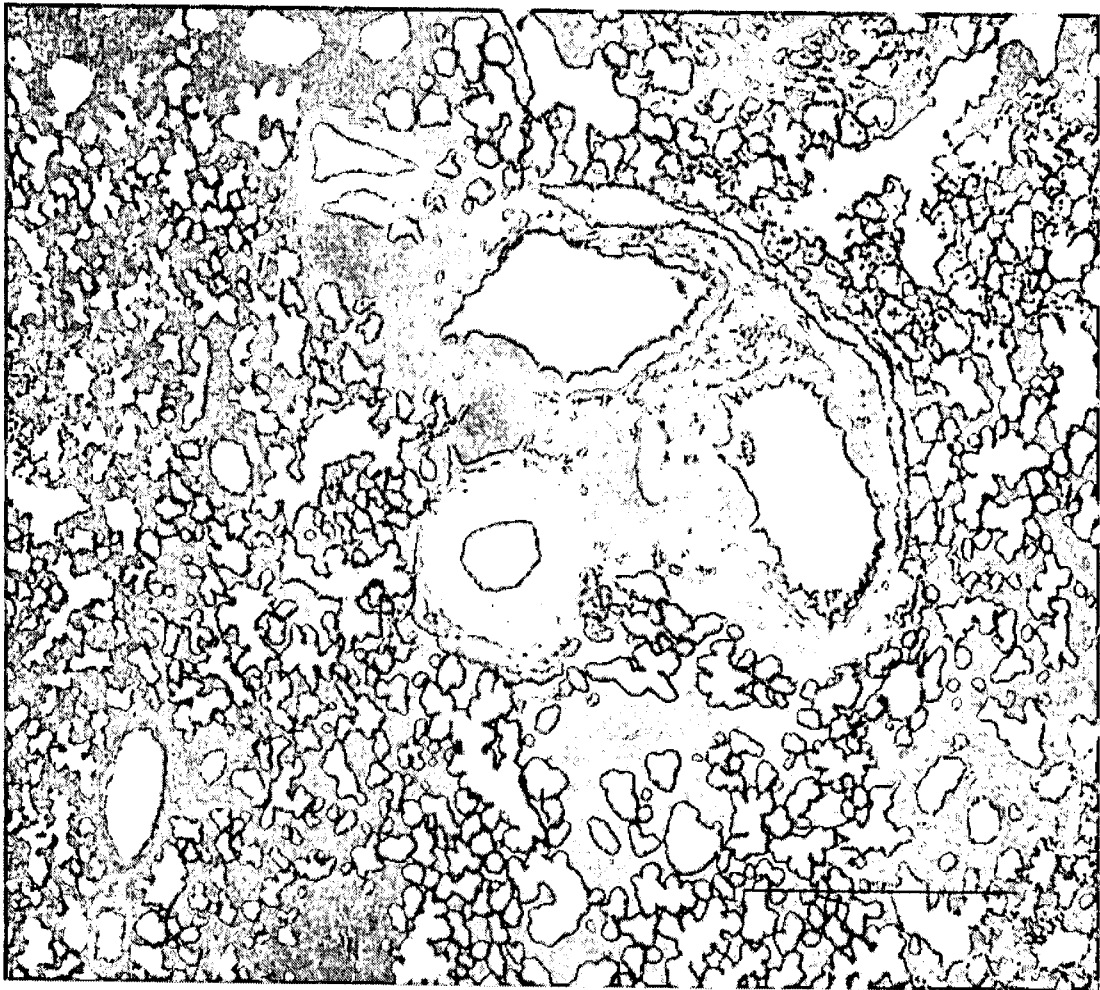
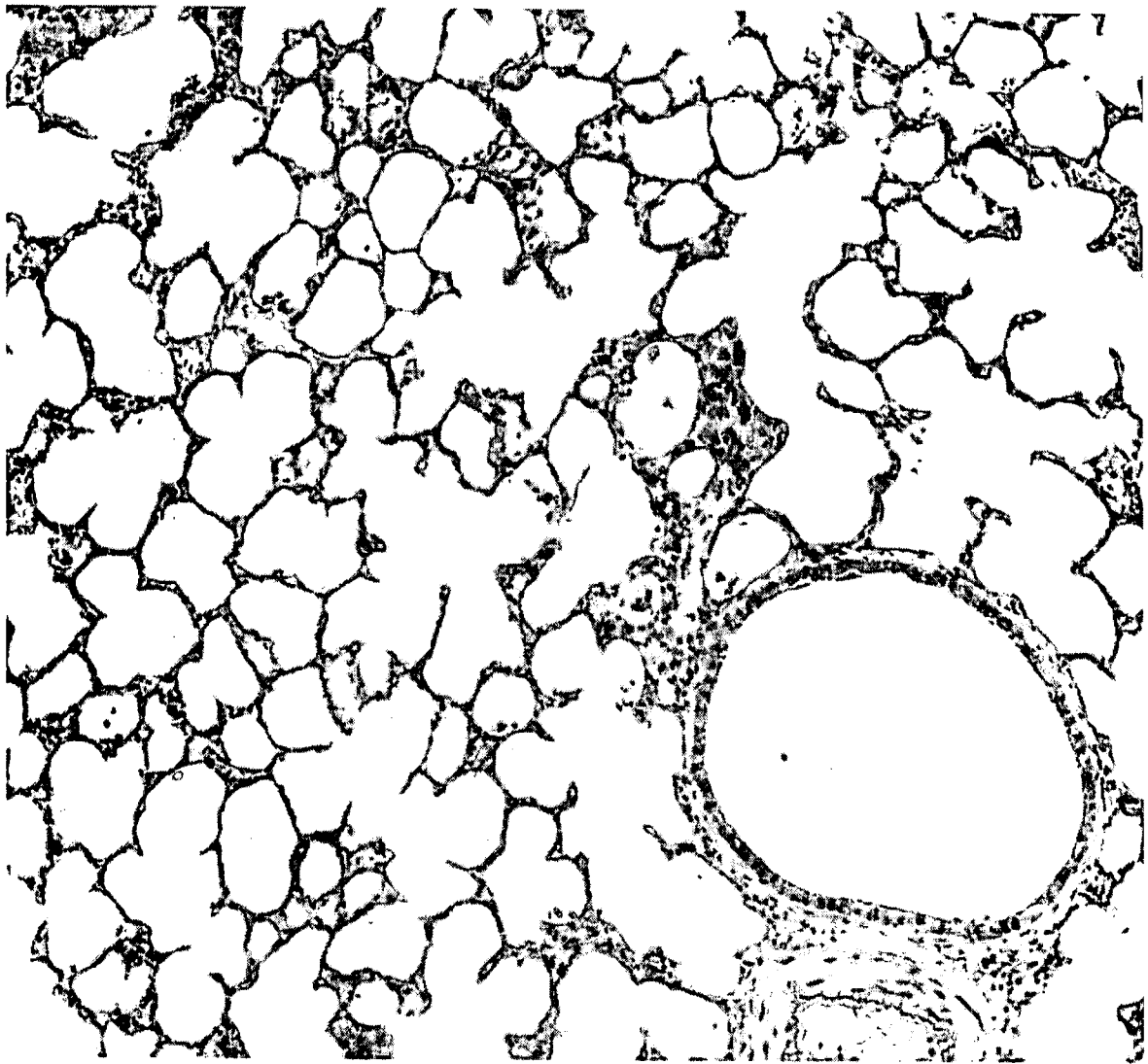


Figura 21



Resumen

El glicoinhibidor aquí reivindicado impide la adherencia de bacterias que afectan el tracto respiratorio de mamíferos. El glicoinhibidor de la adherencia está compuesto de una mezcla de carbohidratos que se unen a las adhesinas bacterianas y/o a los receptores celulares del hospedero bloqueando la interacción bacteria - hospedero, lo que impide la adherencia bacteriana al epitelio y el desarrollo de la infección.

Referencias

1. Aktories K., Orth J.H.C., Adler B. *Pasteurella multocida: Molecular Biology, Toxins and Infection*. 2012. Springer eBooks.
2. Al-Haddawi M., Jasni S., Zamri-Saad M., Mutalib A., Zulkifli I., Son R and Sheikh-Omar A. 2000. In vitro study of *Pasteurella multocida* adhesion to trachea, lung and aorta of rabbits. *Veterinary Journal*. Vol. 159, No. 3, pp. 274-281.
3. Aland A. and Madec F. 2009. *Sustainable Animal Production: The Challenges and Potential Developments for professional farming*. Wageningen academic Publishers. The Netherlands (pp. 248), 496pp
4. Ataei S., Burchmore R., Hodgson J., Finucane A., Parton R. and Coote J. 2009. Identification of immunogenic proteins associated with protection against haemorrhagic septicaemia after vaccination of calves with a live-attenuated *aroA* derivative *Pasteurella multocida* B:2. *Research in Veterinary Science*. Vol. 87, No. 2, pp. 207-210.
5. Bavington C. and Page C. 2005. Stopping bacterial adhesion: a novel approach to treating infections. *Respiration*. Vol. 72, No. 4, pp. 335-344.
6. Shade F.J., Goodnow R.A., Johnson R.C. 1981. Intranasal vaccination of dogs with liver avirulent *Bordetella bronchiseptica*: correlation of serum agglutination titer and the formation of secretory IgA with protection against experimentally induced infectious tracheobronchitis. *American Journal of Veterinary Research*. Vol. 42, No. 7, pp.1130-2.
7. Brooks K. R., Raper K. C., Ward C. E., Holland B. P., C. R. Krehbiel, and Step D. L. 2011. Economic effects of bovine respiratory disease on feedlot cattle during backgrounding and finishing phases1. *The Professional Animal Scientist*. Vol. 27, pp. 195–203
8. Chalker V.J., Toomey C., Opperman S., Brooks H. W., Ibuoye M.A., Brownlie J. and Rycroft A.N. 2003. Respiratory Disease in Kennelled Dogs: Serological Responses to *Bordetella bronchiseptica* Lipopolysaccharide Do Not Correlate with Bacterial Isolation or Clinical respiratory symptoms. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. Vol. 10, No. 3, pp. 352
9. Dabo S., Confer A., Montelongo, M., York P. and Wyckoff J. 2008. Vaccination with *Pasteurella multocida* recombinant OmpA induces strong but non-protective and deleterious Th2-type immune response in mice. *Vaccine*. Vol. 26, No. 34, pp. 4345-4351.
10. Davis R., Jayappa H., Abdelmagid O.Y., Armstrong R., Sweeney D. and Lehr C. 2007. Comparison of the mucosal immune response in dogs vaccinated with either an intranasal avirulent live culture or a subcutaneous antigen extract vaccine of *Bordetella bronchiseptica*. *Veterinary Therapeutics*. 2007. Vol. 8. No. 1, pp. 32-40.
11. Davies J. and Davies D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. 2010. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* Vol. 74, No. 3, pp. 417-433

12. Deeb B.J., DiGiacomo R.F., Bernard B.I. and Silbernagel S.M. 1990. *Pasteurella multocida* and *Bordetella bronchiseptica* infections in rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*. Vol. 28, No. 1, pp. 70-75
13. DiGiacomo R.F., Xu Y.M., Allen V., Hinton M.H. and Pearson G.R. 1991. Naturally acquired *Pasteurella multocida* infection in rabbits: clinicopathological aspects. *Canadian Journal of Veterinary Research*. Vol. 55, No.3, pp. 234–238.
14. Ellis J.A., Krakowka G.S., Dayton A.D. and Konoby C. 2002. Comparative efficacy of an injectable vaccine and an intranasal vaccine in stimulating *Bordetella bronchiseptica*-reactive antibody responses in seropositive dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Vol. 220, No. 1, pp. 43-48
15. Gopinathan L., Kirimanjeswara G.S., Wolfe D.N., Kelley M.L., Harvill E.T. 2007. Different mechanisms of vaccine-induced and infection-induced immunity to *Bordetella bronchiseptica*. *Microbes and Infection*. Vol. 9, No. 4, pp. 442-448
16. Glorioso J., Jones G., Rush H., Pentler L., Darif C. and Coward J. 1982. Adhesion of type A *Pasteurella multocida* to rabbit pharyngeal cells and its possible role in rabbit respiratory tract infections. *Infection and Immunity*. Vol. 35, No 3, pp. 1103-1109.
17. Harper M., Michael F., John M., Vinogradov E., Steen J., Dorsten L., Steen J., Turni C., Blackall P., Adler B., Cox A. and Boyce, J. 2013. *Pasteurella multocida* Heddleston serovar 3 and 4 strains share a common lipopolysaccharide biosynthesis locus but display both inter – and intrastain lipopolysaccharide heterogeneity. *Journal of Bacteriology*. Vol. 195, No. 21, pp. 4854.
18. Hatfaludi T., Al-Hasani K., Boyce J. and Adler B. 2010. Outer membrane proteins of *Pasteurella multocida*. *Veterinary Microbiology*. Vol. 144, No. 1-2, pp.1-17.
19. Horiguchi Y. Swine atrophic rhinitis caused by *Pasteurella multocida* toxin and *Bordetella dermonecrotic* toxin. 2012. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Vol. 361, pp. 113-129
20. Idanpaan-Heikkilä I., Simón P., Zopf, D., Vullo T., Cahill P., Sokol K. and Tuomanen E. 1997. Oligosaccharides interfere with the establishment and progression of experimental Pneumococcal pneumonia. *The Journal of Infectious Diseases*. Vol. 176, No. 3; pp.704:712.
21. Jacobs A.A., Chalmers W.S., Pasman J., van Vugt F., Cuenen L.H. 1993. Feline bordetellosis: challenge and vaccine studies. *The Veterinary Record*. Vol. 133, No. 11, pp. 260-263
22. Jacobs A.A., Theelen R.P., Jaspers R., Horspool L.J., Sutton D., Bergman J.G. and Paul G. 2005. Protection of dogs for 13 months against *Bordetella bronchiseptica* and canine parainfluenza virus with a modified live vaccine *The Veterinary Record*. Vol. 157. No. 1, pp. 19-23
23. Jacques M. and Foiry B. 1987. Electron microscopic visualization of capsular material of *Pasteurella multocida* types A and D labeled with polycationic ferritin. *Journal of Bacteriology*. Vol. 169, No. 8, pp. 3470-3472.
24. Jacques M., Goy G. and Mittal K. 1988. Hemagglutinating properties of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Canadian Journal Microbiol.* Vol. 34, No. 9, pp. 1046-1049.

25. Jaramillo J., Díaz F., Hernández P., Debray H., Trigo F., Mendoza G. and Zenteno E. 2000. Purification and characterization of an adhesin from *Pasteurella haemolytica*. *Glycobiology*. Vol. 10, No. 1, pp. 31-37.
26. Kang M.L., Kang S.G., Jiang H.L., Shin S.W., Lee D.Y., Ahn J.M., Rayamahji N., Park I.K., Shin S.J., Cho C.S. and Yoo H.S. 2006. In vivo induction of mucosal immune responses by intranasal administration of chitosan microspheres containing *Bordetella bronchiseptica* DNT. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. Vol. 63, No. 2, pp. 215-220
27. Katsuda K., Hoshinoo K., Ueno Y., Kohmoto M. and Mikami O. 2013. Virulence genes and antimicrobial susceptibility in *Pasteurella multocida* isolates from calves. *Veterinary Microbiology*. Vol. 167, No. 3-4, pp. 737-741.
28. Mann P., Goebel E., Barbarich J., Pillone M., Kennett M. and Harvill E. 2007 . Use of a genetically defined double mutant strain of *Bordetella bronchiseptica* lacking adenylate cyclase and type III secretion as a live vaccine. *Infection and Immunity* Vol. 75, No. 7, pp. 3665-3672.
29. Menozzi F.D., Mutombo R., Renauld G., Gantiez C., Hannah J.H., Leininger E., Brennan M.J. and Locht C. 1994. Heparin-inhibitable lectin activity of the filamentous hemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*. Vol. 62, No. 3, pp. 769-778.
30. Novotny P., Kobisch M., Cownley K., Chubb A P, and Montaraz J.A. 1985. Evaluation of *Bordetella bronchiseptica* vaccines in specific-pathogen-free piglets with bacterial cell surface antigens in enzyme-linked immunosorbent assay. *Infection and Immunity*. Vol. 50, No. 1, pp. 190–198.
31. Pistole T. 1981. Interaction of bacteria and fungi with lectins and lectin-like substance. *Annual Review of Microbiology*. Vol. 35, pp. 85-112.
32. Plotkin B.J. and Bemis D.A. 1984. Adherence of *Bordetella bronchiseptica* to hamster lung fibroblasts. *Infection and Immunity*. Vol. 46, No. 3, pp. 697-702.
33. Praveena P., Periasamy S., Kumar A. and Sing N. 2010. Cytokine profiles, apoptosis and pathology of experimental *Pasteurella multocida* serotype A1 infection in mice. *Research in Veterinary Science*. Vol. 89, No. 3, pp. 332-339.
34. Robertson J. F., Wilson D. and. Smith W. J. 1990. Atrophic rhinitis: the influence of the aerial environment. *Animal Production*. Vol. 50, No. 1, pp. 173-182.
35. Ruffolo, C., Tennent, J., Michaiski, W. and Adler, B. 1997. Identification, purification and characterization of the type 4 fimbriae of *Pasteurella multocida*. *Infection and Immunity*. Vol. 65, No. 1, pp. 339-343.
36. Schulz B.S., Kurz S., Weber K., Balzer H.J. and Hartmann K. 2014. Detection of respiratory viruses and *Bordetella bronchiseptica* in dogs with acute respiratory tract infections. *Veterinary Journal*. Vol. 201, No. 3, pp. 365-369.
37. Shina A, Hart C.A., Stenton M.D., Dawson S., Mccracken C.M., Binns S.H., Gaskell R.M. and Winstanley C. 2002. Distribution of *fim3* and *flaA* TTGE sequence types amongst isolates of

Bordetella bronchiseptica from different host animals. *Journal of Medical Microbiology*. Vol. 51, No. 7, pp. 557–563

38. Smith I.M., Baskerville A.J., Brothwell E. and Oliphant J. 1982. Immunogenicity of killed *Bordetella bronchiseptica* vaccines in the mouse. *Research in Veterinary Science*. Vol. 32, No. 22, pp. 48-52.

39. Snowden G.D., Van Vleck L.D., Cundiff L.V. and Bennett G.L. 2006. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Environmental, genetic, and economic factors. *Journal of Animal Science*. Vol. 84, No. 8, pp. 1999-2008.

40. Tuomanen, E., Towbin H., Rosenfelder G., Braun D., Larson G., Hansson G.C., and Hill R. 1988. Receptor analogs and monoclonal antibodies that inhibit adherence of *Bordetella pertussis* to human ciliated respiratory epithelial cells. *Journal of Experimental Medicine*. Vol. 168, no. 1, pp. 267-

41. USDA APHIS. 2000. VS/i,III,15.

42. USDA. National Agricultural Statistics Service. 2011. Cattle Death Loss. 5, 10, 12.

43. Zhao Z., Xue Y., Wang C., Ding K., Wu B., He Q., Cheng X. and Chen H. 2011. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella bronchiseptica* isolates from pigs with respiratory diseases on farms in China. *Journal of Veterinary Medical Science*. Vol. 73, No. 1, pp.103-106. A

44. Zhao Z., Wang C., Xue Y., Tang X., Wu B., Cheng X., He Q., Chen H. 2011. The occurrence of *Bordetella bronchiseptica* in pigs with clinical respiratory disease. *Veterinary Journal*. Vol.188, No. 3, pp. 337-340. B