



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 312 758**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/012 (2006.01)
C12N 1/36 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03713628 .0**
(96) Fecha de presentación : **21.02.2003**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1476558**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **17.11.2004**

(54) Título: **Selección de cepas *Eimeria* de aves de corral mediante esporozitos extraintestinales.**

(30) Prioridad: **26.02.2002 US 360088 P**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2009

(73) Titular/es: **Wyeth**
Five Giralda Farms
Madison, New Jersey 07940, US

(72) Inventor/es: **Davelaar, Frans, Gerrit**

(74) Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

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

DESCRIPCIÓN

Selección de cepas *Eimeria* de aves de corral mediante esporozitos extraintestinales.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al desarrollo de nuevas cepas de especies de *Eimeria* que tienen potentes propiedades inmunógenas y baja patogenicidad, y que son útiles en la producción de oocistos para vacunas contra coccidiosis. Además, la invención se refiere a nuevos métodos para obtener cepas atenuadas de especies de *Eimeria* que son útiles para formular vacunas contra la coccidiosis.

10 **Antecedentes de la invención**

La coccidiosis es una enfermedad aviar causada por la infección de una o más de las muchas especies de coccidios, que son parásitos protozoos intracelulares del subtipo *Apicomplexa* y del género *Eimeria*. Se sabe que la coccidiosis está causada por varias especies distintas de *Eimeria*, a saber: *Eimeria acervulina*, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. praecox*, y quizás *E. mivati* y *E. hageni*. Las especies difieren en sus efectos patógenos en las aves, y también el tipo de aves desempeña un papel. Así, un pollo de engorde sufrirá considerables lesiones producidas por un parásito tal como *E. acervulina* debido a que infecta gran parte del intestino delgado, que es uno de los principales centros donde se lleva a cabo la digestión de los alimentos.

Durante su ciclo vital el parásito de *Eimeria* atraviesa varias fases. El ciclo vital comienza cuando el pollo ingiere el parásito en su fase infecciosa, denominado oocisto esporulado, durante la alimentación en el suelo o por inhalación de polvo. La pared del oocisto esporulado se rompe debido a la acción mecánica en la molleja y en el intestino, con lo que se liberan cuatro esporocistos. Los esporocistos pasan al duodeno, donde quedan expuestos a las enzimas biliares y digestivas que provocan la liberación de un promedio de dos esporozoítos por esporocisto.

Los esporozoítos son móviles y buscan células epiteliales adecuadas del hospedador con el objeto de penetrar y reproducirse en ellas. Tras la infección de una célula epitelial, el parásito entra en la fase de esquizonte del ciclo celular, en la que produce de 8 a 16 hasta más de 200 merozoítos por esquizonte. Una vez liberados del esquizonte, los merozoítos son capaces de continuar la infección del epitelio. Después de dos a cinco de estos ciclos de reproducción asexual, los merozoítos intracelulares se convierten en formas sexuales conocidas como hembra o macrogametocito, y macho o microgametocito. Tras la fertilización del macrogametocito por los microgametos liberados a partir del microgametocito, se forma un cigoto que crea a su alrededor una pared quística. El oocisto recién formado se disemina con las heces del pollo infectado.

Cuando se dan las condiciones ambientales adecuadas de temperatura y humedad y suficiente oxígeno en el aire, el oocisto esporulará para formar la fase infecciosa, con lo que será capaz de infectar un nuevo hospedador y extender de este modo la enfermedad. Por tanto, no es necesario ningún hospedador intermediario para la transferencia del parásito de un ave a otra.

El resultado de la infección del tubo digestivo de un ave por un parásito de *Eimeria* puede ser una reducción en el aumento de peso, una disminución en el procesamiento de los alimentos, una paralización en la producción de huevos, y, en algunos casos, la muerte. El aumento en la producción intensiva de aves de corral se ha visto acompañado de importantes pérdidas debidas a este parásito. Se calcula que las pérdidas en Estados Unidos y Europa superan cientos de millones de dólares al año.

En la actualidad se han puesto en marcha varias medidas para controlar la coccidiosis. Antes del advenimiento de los agentes quimioterápicos los principales métodos empleados eran la mejora de la higiene utilizando desinfectantes, junto con la eliminación mecánica de los desechos. Además, la introducción de agentes coccidiostáticos en los alimentos y en el agua potable, junto con prácticas adecuadas de mantenimiento, se ha traducido en un cierto éxito en el control de la enfermedad. Sin embargo, se ha comprobado que dichos agentes presentan eficacia reducida con los años, debido en parte al desarrollo de cepas de coccidios resistentes a los fármacos. Además, se ha comprobado que varios agentes quimioterápicos dejan residuos en la carne de aves comerciales, con lo que deja de ser apta para el consumo.

Se han llevado a cabo otras medidas inmunológicas para el control de la enfermedad, incluido el desarrollo de vacunas con organismos vivos y la utilización de técnicas de ingeniería genética para formular vacunas. Muchas de dichas medidas se han centrado en la utilización de proteínas de *Eimeria* como componente activo de la vacuna. Por ejemplo, Tomley *et al.*, en las patentes US nº 5.885.568 y nº 6.001.363, proponen una proteína de *Eimeria* con propiedades inmunógenas, así como secuencias de ADN que codifican dichas proteínas. Una estrategia similar ha sido propuesta por Kok *et al.*, patente US nº 6.100.241. Una molécula de ADN que tiene una secuencia de ácido nucleico particular se presenta en Andrews *et al.*, patentes US nº 4.874.705 y nº 5.187.080; mientras que Mewman *et al.*, patente US nº 5.028.694, describen una proteína antigénica purificada capaz de provocar una respuesta inmunitaria en un pollo contra *Eimeria necatrix* o *Eimeria tenella*. También se describe una vacuna contra la coccidiosis en Brown *et al.*, patente US nº 6.019.985.

En la técnica actual es necesario encontrar una nueva vacuna contra la coccidiosis que sea eficaz, de fácil administración, y rentable. También son necesarias cepas nuevas e inventivas de la especie *Eimeria* que pueden utilizarse para provocar una respuesta inmunitaria en aves de corral, y proporcionar de este modo oocistos adecuados para una vacuna. También son necesarios nuevos métodos para encontrar cepas atenuadas de *Eimeria* que puedan utilizarse para el desarrollo de vacunas. También es necesario en la técnica el desarrollo de cepas de *Eimeria* cuyos oocistos, cuando se incorporan en una vacuna, proporcionan protección cruzada contra una gama más amplia de especies de *Eimeria*.

Sumario de la invención

Por consiguiente, un primer objetivo de la presente invención es proporcionar una cepa aislada de un protozoo, caracterizada porque dicha cepa se ha atenuado para producir oocistos no patógenos que provocan una respuesta inmunitaria contra la coccidiosis en aves de corral.

Se ha comprobado que las especies de protozoos que tienen un ciclo vital con coccidios y que, por tanto, generan esporozoítos extraintestinales, son adecuadas para su utilización en el desarrollo de vacunas. Por tanto, una primera realización de la invención se refiere a una cepa aislada de un protozoo, como se ha descrito anteriormente, en la que dicha cepa es una especie de coccidios atenuada.

Se ha comprobado que las especies del género *Eimeria* son particularmente ventajosas para el desarrollo de nuevas vacunas víricas atenuadas contra la coccidiosis. Sorprendentemente, se comprobado que las especies de *Eimeria* pueden atenuarse mediante propagación por pases en serie para producir oocistos no patógenos que mantienen la capacidad de provocar una respuesta inmunitaria contra la coccidiosis en aves de corral. Por consiguiente, un objetivo de la invención es proporcionar una cepa aislada no patógena de una especie seleccionada de entre el género *Eimeria*, en la que dicha cepa se ha atenuado para producir oocistos no patógenos que generan una respuesta inmunitaria contra la coccidiosis en aves de corral.

En particular, se ha comprobado que cuando se hace pasar de forma sucesiva una cepa de una especie de *Eimeria* a través de por lo menos nueve aves exentas de patógenos específicos (SPF, por sus siglas en inglés), puede producirse una cepa atenuada no patógena de *Eimeria* que mantiene la capacidad para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra la coccidiosis en aves de corral. Por consiguiente, una realización preferida de la invención se refiere a una cepa aislada de una especie seleccionada de entre el género *Eimeria*, en la que dicha cepa se ha atenuado mediante por lo menos nueve pases en serie a través de aves SPF, para producir oocistos no patógenos que generan una respuesta inmunitaria protectora contra la coccidiosis en aves de corral.

La propagación excesiva por pases en serie de la especie de *Eimeria* a través de aves SPF puede dar lugar a una reducción en la capacidad de la cepa atenuada resultante para provocar una respuesta inmunitaria protectora contra la coccidiosis. A la hora de desarrollar una cepa atenuada con este fin es necesario alcanzar un equilibrio entre el carácter suficientemente no patógeno mientras se mantiene al mismo tiempo la capacidad de la cepa atenuada para provocar una respuesta inmunitaria que proporciona protección eficaz contra la coccidiosis. Por consiguiente, el número de pases en serie utilizados en el desarrollo de cepas eficaces adecuadas es también preferentemente igual o inferior a veinticinco, más preferentemente igual o inferior a veinte, y más preferentemente entre nueve y quince pases en serie. En la realización más preferida, se obtiene una atenuación adecuada realizando de nueve a doce pases en serie en aves SPF con una cepa de una especie de *Eimeria*.

Para los efectos de la presente invención, las cepas de una especie de *Eimeria* se seleccionan preferentemente de entre el grupo constituido por *Eimeria acervulina*, *Eimeria maxima*, *Eimeria tenella*, *Eimeria necatrix*, *Eimeria brunetti*, *Eimeria mitis*, *Eimeria praecox*, *Eimeria mivati*, *Eimeria hagani*, *Eimeria adenoides*, *Eimeria gallopavonis*, *Eimeria meleagridis* y *Eimeria meleagrimitis*.

Se ha comprobado que las cepas de la especie *Eimeria acervulina* son particularmente susceptibles a la atenuación según la presente invención, especialmente cuando se trata de generar inmunidad en pollos. Por consiguiente, una realización particularmente preferida de la invención se refiere a una cepa que se ha atenuado para producir oocistos no patógenos que generan una respuesta inmunitaria contra la coccidiosis, en la que dicha cepa pertenece a la especie *Eimeria acervulina*. En la realización más preferida de la invención, se proporciona una cepa de *Eimeria* que tiene las características inmunógenas de la cepa de *E. acervulina* depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares con el número de acceso 02010911 (también identificada como cepa A3C2A2).

Un tercer objetivo de la presente invención es proporcionar una cepa aislada como se ha descrito anteriormente en la presente memoria, para su utilización en la generación de inmunidad contra la coccidiosis en aves de corral.

Un cuarto objetivo la invención es proporcionar una vacuna para aves de corral que comprende oocistos no patógenos de una cepa atenuada de una especie seleccionada de entre el género *Eimeria* y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que dichos oocistos provocan una respuesta inmunitaria contra la coccidiosis. Para los efectos de la presente vacuna, los oocistos son preferentemente oocistos extraintestinales.

También se comprobado que se puede generar una respuesta inmunitaria protectora contra la coccidiosis en aves mediante la inoculación con una vacuna que comprende por lo menos aproximadamente 10^4 oocistos de una especie adecuadamente atenuada de *Eimeria* por dosis. En una realización preferida la vacuna de la presente invención com-

prende por lo menos aproximadamente 10^4 oocistos de *Eimeria* por dosis, en la que dicha *Eimeria* se ha atenuado mediante por lo menos nueve pases en serie a través de aves SPF. La especie de *Eimeria* empleada para este fin es preferentemente *Eimeria acervulina*.

Un quinto objetivo de la invención es proporcionar un procedimiento para la preparación de oocistos no patógenos de una especie de *Eimeria*, en el que dichos oocistos son capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra la coccidiosis en aves de corral, en el que dicho procedimiento comprende la atenuación de una cepa de una especie de *Eimeria* mediante propagación por pases en serie de dicha cepa por lo menos nueve veces en aves SPF. En una realización preferida, se atenúa una cepa de una especie de *Eimeria* mediante un procedimiento que comprende las etapas:

- (i) inocular por lo menos un ave SPF con oocistos de *Eimeria*;
- (ii) extraer sangre del ave de la etapa (i);
- (iii) inocular por lo menos una segunda ave SPF con sangre de la etapa (ii);
- (iv) recoger oocistos de *Eimeria* a partir del ave de la etapa (iii);
- (v) multiplicar los oocistos recogidos en la etapa (iv) en por lo menos otra ave SPF, y extraer oocistos de la misma;

en el que las etapas (i) a (v) representan un ciclo que se repite por lo menos tres veces, y en el que los oocistos recogidos en la etapa (v) de cada ciclo se utilizan en la inoculación de la etapa (i) del siguiente ciclo.

En otra realización preferida, la cepa seleccionada para su atenuación mediante el procedimiento de la invención es una cepa de la especie *Eimeria acervulina*.

Un sexto objetivo de la invención es proporcionar oocistos no patógenos, que se obtienen mediante un procedimiento según la descripción anterior, en el que dichos oocistos son capaces de provocar una respuesta inmunitaria contra la coccidiosis en aves de corral.

Un objetivo final de la invención es proporcionar un método para inocular aves de corral contra la coccidiosis, que comprende administrar a dichas aves de corral por lo menos aproximadamente 10^4 oocistos procedentes de una forma atenuada de *Eimeria acervulina*, en la que dicha forma de *Eimeria* se ha atenuado mediante por lo menos nueve pases en serie a través de aves SPF.

La exposición anterior y otras características y ventajas de la invención podrán apreciarse mejor a partir de la descripción detallada de las realizaciones preferidas de la invención presentadas a continuación.

Descripción detallada de las formas de realización preferidas

Todas las realizaciones de la invención descritas en lo sucesivo en la presente memoria están previstas para su utilización en todas las aves de corral. Tal como se utiliza en la presente memoria, “aves de corral” se refiere a aves domesticadas destinadas a la producción de huevos o carne, e incluyen, sin limitación, especies de importancia comercial tales como pollos, pavos, patos, gansos, gallinas de Guinea, faisanes, palomas, pavos reales, gallinas Bantam, y similares. En una realización preferida la expresión “aves de corral” se refiere a especies domésticas de pollos y pavos, más preferentemente la invención se refiere a aves de corral que son especies de pollos.

Podrá apreciarse que no es necesario todo el oocisto de una cepa atenuada según la presente invención para provocar una respuesta inmunitaria contra la coccidiosis. Por consiguiente, en este sentido, la invención se refiere a un microorganismo o microorganismos enteros o un fragmento o fragmentos de los mismos, incluidas proteínas, polipéptidos o secuencias de aminoácidos, que son útiles para provocar o generar una respuesta inmunitaria en un animal tal como las aves de corral.

La expresión “no patógeno” se interpretará conforme al conocimiento del experto en la materia, en el sentido de que cualquier programa de vacunación puede provocar una reacción adversa en un pequeño porcentaje de aves inoculadas, y en algunos casos muertes a consecuencia de tal programa. La expresión “no patógeno” se considerará relacionada con los programas de vacunación en los que puedan darse tales casos.

La puntuación media de lesiones puede ser un indicador particularmente útil de la patogenicidad de una cepa atenuada según la presente invención. Este parámetro puede valorarse de forma adecuada midiendo el desarrollo de lesiones en aves SPF tras la inoculación (p.i). A los seis días p.i. las aves se sacrifican y se les practican autopsias. A continuación las lesiones en los intestinos pueden puntuarse con arreglo a lo descrito por Johnson y Reid; “Anticoccidial drugs: Lesion scoring techniques in battery and floor pen experiments with chickens”; Exp. Parasitol. 1970; 28: 30-36. Para los efectos de la presente invención una cepa atenuada no patógena puede definirse más específicamente como una cepa atenuada que da lugar a una puntuación media de lesiones de menos de 2,0 para las aves de un grupo que ha recibido un inoculación de 10^4 oocistos atenuados, más preferentemente dicha puntuación media de lesiones es igual o inferior a 1,8; y lo más preferentemente es que sea igual o inferior a 1,5.

Para los efectos de la presente invención una “respuesta inmunitaria” se considerará que se refiere a una respuesta de inmunidad celular o de inmunidad humoral que genera un cierto nivel de inmunidad contra la coccidiosis, de modo que en el caso de una exposición posterior a una cepa virulenta de protozoos se confiera algún grado de protección a las aves vacunadas frente a la muerte, la enfermedad, o el deterioro del estado general. El grado de protección generado por la inoculación con una cepa atenuada de la invención puede definirse en función del desarrollo de lesiones en aves cuando se infectan de nuevo posteriormente con la cepa original o con una cepa similar no atenuada. En este sentido, una respuesta inmunitaria protectora puede definirse como una respuesta que, tras la reinfección con una dosis de 10^4 de oocistos de la cepa original o de una cepa similar no atenuada, da lugar a una puntuación media de lesiones igual o inferior a 1,50, más preferentemente igual o inferior a 1,00, más preferentemente igual o inferior a 0,50, y aún más preferentemente igual o inferior a 0,25. Según la metodología citada anteriormente, en la realización más preferida se registrará una puntuación media de lesiones de 0,00 para cepas atenuadas capaces de generar la máxima respuesta inmunitaria protectora contra la coccidiosis en aves de corral. “Inmunógena” ha de interpretarse como la capacidad de generar una respuesta inmunitaria según dicha definición.

Para los efectos de la presente invención la expresión “inocular” se refiere a cualquier forma de introducir los agentes infecciosos en las aves.

En una realización, la invención se refiere un método para obtener una cepa inmunógena adecuada para la generación de oocistos para su utilización en una vacuna contra la coccidiosis. El método implica por lo menos aproximadamente tres ciclos de una especie de *Eimeria* en especímenes donantes de aves de corral para obtener una cepa atenuada que presente un inmunógeno adecuado. De este modo, el método puede utilizarse para atenuar la cepa de *Eimeria*, de modo que sea al mismo tiempo no patógena y eficaz para la producción de oocistos que provoquen una respuesta inmunitaria para el desarrollo de vacunas.

En un aspecto adicional de la invención se proporciona un método para atenuar una o más cepas de *Eimeria*, que comprende la propagación sucesiva por pases de la cepa a través de por lo menos tres grupos de aves de corral exentas de patógenos específicos, en el que cada uno de los ciclos comprende por lo menos dos grupos sucesivos de inoculaciones. La invención también proporciona otro método para atenuar *Eimeria acervulina*, que comprende el ciclo de:

- a) inocular por lo menos un primer grupo de aves donantes exentas de patógenos específicos con oocistos generados a partir de una cepa virulenta de *E. acervulina*;
- b) extraer sangre de este primer grupo de aves donantes mediante sacrificio por hemorragia aproximadamente 3 a aproximadamente 6 horas tras la inoculación;
- c) inocular por lo menos un segundo grupo de aves donantes exentas de patógenos específicos con la sangre obtenida;
- d) recoger oocistos del segundo grupo de aves; y
- e) multiplicar los oocistos para completar de este modo sustancialmente el ciclo; y después repetir el ciclo utilizando los oocistos multiplicados en el subprocedimiento e),

de modo que se completan aproximadamente tres ciclos.

En el primer ciclo, el método implica inocular especímenes donantes de aves de corral exentas de patógenos específicos (SPF), preferentemente uno o más pollos donantes, con una cantidad de oocistos de una especie de *Eimeria*. Preferiblemente, la especie es una especie virulenta de *Eimeria* que produce esporozoítos circulantes en las aves de corral hospedadoras, y es más preferentemente *E. acervulina*. La dosis de exposición por unidad de aves de corral, por ejemplo, un ave, se sitúa en el intervalo de aproximadamente 10^6 a aproximadamente 10^8 oocistos, y es preferentemente aproximadamente 1×10^7 oocistos. Los oocistos se esporulan preferentemente antes de la inoculación utilizando métodos disponibles en la técnica. El número de especímenes donantes de aves de corral puede variar algo, pero se encuentra generalmente en el intervalo de aproximadamente 3 a aproximadamente 15 pollos, preferentemente aproximadamente 3 a aproximadamente 12 pollos, siendo preferibles pollos jóvenes recién salidos del cascarón o polluelos.

A continuación, se extrae sangre de por lo menos algunos de los polluelos donantes, preferentemente aproximadamente 3 horas hasta aproximadamente 6 horas tras la inoculación (p.i.), más preferentemente aproximadamente 3 horas p.i. Después se utiliza la sangre extraída de dichos polluelos donantes para inocular, preferentemente por vía oral con los alimentos, otro grupo de especímenes de aves de corral SPF. A continuación se recogen los oocistos de este grupo de aves que han sido inoculadas con las muestras de sangre. Estos oocistos se recogen preferentemente a partir de las heces de las aves infectadas. Dichos oocistos recogidos se multiplican después en un grupo adicional de especímenes de aves de corral SPF. (La multiplicación, tal como se utiliza el término en la técnica, aumenta la cantidad y/o la concentración de oocistos disponibles). Después se recogen las heces de dichos especímenes infectados, y se aíslan los oocistos de las heces. Este procedimiento completaría el primer ciclo. Estos oocistos, a su vez, se utilizan después preferentemente para la propagación por pases adicionales del parásito en un ciclo posterior.

ES 2 312 758 T3

De este modo, un ciclo comprendería los siguientes subprocedimientos:

- 1) Inoculación de la sangre de aves donantes con oocistos esporulados;
- 2) Recogida de muestras de sangre de las aves donantes;
- 3) Inoculación de nuevas aves con sangre obtenida de las aves donantes;
- 4) Recogida de oocistos de las aves inoculadas con muestras de sangre;
- 5) Multiplicación de oocistos, y recogida de los mismos para su utilización en ciclos posteriores.

En el segundo ciclo, los oocistos encontrados en las heces tras la multiplicación y la recogida del primer ciclo mencionados anteriormente se utilizan después para inocular otro grupo de especímenes de aves de corral SPF. Es deseable que los oocistos estén esporulados. En una realización preferida, el nivel de dosis es superior al utilizado en el primer ciclo anterior. Por consiguiente, es deseable que aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 3×10^7 de los oocistos obtenidos en el primer ciclo se utilicen inicialmente para inocular la sangre de aves donantes en el segundo ciclo. Preferiblemente, se utilizan aproximadamente 2×10^7 oocistos por dosis, o aproximadamente el doble de oocistos por dosis utilizados en el primer ciclo. Después, se repiten los subprocedimientos 2) a 5) descritos anteriormente en especímenes de aves de corral SPF en el segundo ciclo.

En el tercer ciclo, los oocistos recogidos a partir de las heces de especímenes de aves de corral infectadas tras el segundo ciclo se utilizan para inocular por lo menos un tercer grupo de aves de corral SPF, hasta un total de tres (3X) ciclos para la cepa particular de *Eimeria*. Al comienzo del tercer ciclo, es deseable que se utilicen aproximadamente 1×10^7 a aproximadamente 3×10^7 de los oocistos obtenidos en el segundo ciclo para la inoculación inicial de la sangre de aves donantes en el tercer ciclo. Preferiblemente, se utilizan aproximadamente 2×10^7 oocistos por dosis, o aproximadamente el doble de oocistos por dosis que el que se utilizó en el primer ciclo. Después, los subprocedimientos 2) a 5) descritos anteriormente se repiten de nuevo como parte del tercer ciclo.

Los expertos en la materia pueden prever ciclos adicionales con oocistos de la cepa de *Eimeria* aplicados a grupos adicionales de aves de corral SPF, pero esta estrategia es menos preferida en la presente memoria por motivos tanto de coste como de tiempo. Los solicitantes han descubierto que se prefiere utilizar un total de aproximadamente tres ciclos como se ha descrito anteriormente.

A continuación se aísla una cepa final de *E. acervulina* después del procedimiento anterior de tres ciclos, que se ha atenuado como resultado del mismo. La cepa se obtiene a partir de uno o más miembros de las aves inoculadas al finalizar el tercer ciclo. La cepa se obtiene utilizando procedimientos de aislamiento disponibles en la técnica. Dicha cepa puede utilizarse después como inmunógeno. La cepa se inocula en un grupo adicional de aves de corral SPF para generar oocistos para una vacuna. Los oocistos se obtienen preferentemente recogiendo los de las heces de las aves de corral expuestas a la cepa. También pueden recogerse a partir de la sangre, si se desea.

Una cepa preferida de *E. acervulina* ha sido aislada en la actualidad e identificada como la cepa A3C2A2, que se ha depositado en la Colección Europea de Cultivos Celulares, en Wiltshire SP4 OJG, Reino Unido, el 19 de diciembre de 2001, con el número de acceso provisional 02010911 (y allí está disponible), y funcionará como cepa inmunógena adecuada.

Se ha comprobado que los oocistos generados a partir de una cepa de *Eimeria* obtenida según la metodología descrita en la presente memoria producen un alto grado de inmunogenicidad cuando se incorporan en una vacuna. Se ha comprobado asimismo que dichos oocistos son también mucho menos patógenos que los generados a partir de la cepa original (antes de los ciclos de inoculación) de *Eimeria*. Los oocistos generados según el procedimiento descrito en la presente memoria presentan también típicamente una protección cruzada más elevada, lo que significa que ofrecen protección contra una gama más amplia de especies de *Eimeria*. De este modo, es deseable que una vacuna de la invención que utilice oocistos de *Eimeria*, preferentemente de *E. acervulina*, ofrezca protección contra por lo menos tres, y preferentemente por lo menos cuatro de otras especies de *Eimeria*, incluidas, sin limitación, *E. maxima*, *E. tenella*, *E. necatrix* y *E. brunetti*.

Por consiguiente, la invención está dirigida también a cubrir otras cepas inmunógenas, así como a productos derivados de las mismas, por ejemplo, oocistos y vacunas que contienen dichos oocistos, que tienen las características de la cepa de *E. acervulina*, y los productos concomitantes obtenidos siguiendo la metodología descrita en la presente memoria.

La vacuna final de la invención debe contener por lo menos aproximadamente 10^4 oocistos por dosis, preferentemente oocistos esporulados, para generar una respuesta inmunógena suficiente en un animal. La vacuna puede contener también una cantidad mayor de oocistos por dosis, tal como por lo menos aproximadamente 10^5 oocistos por dosis; por consiguiente, es deseable un intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 oocistos por dosis.

La vacuna descrita en la presente memoria puede administrarse por vía oral, subcutánea, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa o intranasal, así como por otras vías de administración conocidas en la técnica. Entre

las anteriores es generalmente preferida la vía de administración oral. De este modo, la vacuna puede administrarse a aves de corral jóvenes en el agua potable, o con los alimentos, por ejemplo. La vacuna puede administrarse *in ovo*, pero se administra generalmente a animales jóvenes *post ovum*, siendo generalmente los mejores candidatos aquellos que tienen entre pocas horas y pocas semanas de edad. En general se prevé administrar una dosis por animal, pero también se encuentran dentro del alcance de la invención dosis de refuerzo posteriores.

La vacuna de la invención se formula con un excipiente farmacéuticamente aceptable, que puede incluir medios acuosos así como suspensiones o emulsiones, y similares. El excipiente puede incluir también sales, conservantes, tampones de pH, estabilizantes y emulsionantes disponibles en la técnica. Además, la vacuna puede contener también uno o más adyuvantes para mejorar el rendimiento o aumentar la actividad, tal como la respuesta inmunitaria, y puede incluir, por consiguiente, materiales tales como aceites, muramil-dipéptido, hidróxido de aluminio, saponina, polianiones, sustancias anfipáticas, y similares. Una cantidad preferida de un excipiente farmacéuticamente aceptable por dosis (incluido cualquier adyuvante o adyuvantes) se encuentra, por tanto, dentro del intervalo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 10 ml, siendo preferentemente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 5 ml, y aún más deseable de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1 ml.

La vacuna descrita en la presente memoria también puede contener otros agentes inmunógenos para las aves de corral. De este modo, por ejemplo, también pueden formularse como parte de la vacuna de la invención inmunógenos relacionados con patógenos responsables de enfermedades tales como la causada por el virus de la enfermedad de Newcastle (NDV). Por tanto, la vacuna descrita en la presente memoria puede ser monovalente, o puede ser también bivalente, trivalente, tetravalente, o pentavalente, etc.

Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar varios aspectos preferidos de la invención, pero no deben considerarse como limitativos del alcance de la misma.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se presentan exclusivamente a título ilustrativo, y no deben considerarse como limitativos del alcance de la invención.

1. Materiales y Métodos

1.1 Materiales

1.1.1 Polluelos y avicultura

Los pollos de engorde Arbor Acres machos, exentos de coccidiosis, se obtuvieron del criadero comercial de Arbor Acres, en Putten, Holanda, y se alojaron en jaulas en condiciones aisladas cuando tenían un día de edad. Parte de los polluelos se utilizaron como polluelos donantes, y dichos polluelos donantes fueron inoculados con oocistos esporulados de *E. acervulina* a los 14 días de edad. Todas las aves donantes destinadas a un pase de propagación fueron alojadas en una jaula.

Se extrajo sangre de los polluelos donantes, tres animales cada vez, a las 3 o 6 horas tras la inoculación (p.i.), y cada muestra individual de sangre se utilizó para inocular otros tres polluelos. Las aves que recibieron sangre de un polluelo donante fueron alojadas en una jaula. Se examinaron las heces para detectar oocistos, y los oocistos de muestras positivas seleccionadas se utilizaron para la siguiente propagación por pases. Se llevaron a cabo tres ciclos en serie para obtener la cepa inmunógena final.

Los oocistos de las muestras positivas seleccionadas se multiplicaron en cuatro polluelos SPF por muestra antes del siguiente ciclo. Los polluelos SPF se obtuvieron del Servicio de Salud Animal, en Deventer, Holanda, y se alojaron en grupos en celdas aisladas.

Se determinó la patogenicidad de los oocistos recogidos después de los ciclos 1 y 3 y se comparó con la patogenicidad de la cepa original utilizando 10 pollos de engorde Arbor Acres machos, exentos de coccidiosis, por dosis, y cuatro dosis por cepa; un total de 80 aves por ciclo. Parte de los polluelos utilizados para la determinación de la patogenicidad de los oocistos recogidos después del ciclo 3 fueron utilizados también para determinar la inmunogenicidad de dichos oocistos tras la reinoculación con la cepa original en comparación con la inmunogenicidad de la cepa original. Los polluelos se alojaron en grupos en jaulas en condiciones de aislamiento.

Todas las aves fueron alojadas en el animalario del Servicio de Salud Animal, en Deventer, Holanda, en la casa 3 de Het Spelderholt, situada en Beekbergen, Holanda, y recibieron alimentos exentos de aditivos anticoccidícos.

Primer ciclo

Para este ciclo se utilizaron 26 pollos de engorde. Se inocularon ocho polluelos donantes con oocistos esporulados de *E. acervulina* y se extrajo sangre de seis polluelos donantes, tres animales cada vez, a las 3 y 6 horas p.i. Cada una de las seis muestras de sangre individuales se utilizó para inocular otros tres polluelos, y los oocistos purificados a

ES 2 312 758 T3

partir de las muestras de heces positivas fueron multiplicados en polluelos SPF. Se determinó la patogenicidad de una cepa aislada multiplicada. A continuación se muestran los grupos y el número de polluelos.

Grupo	N.º de polluelos	Utilización
D	8	Polluelos donantes
A1, A2, A3	3 x 3	Polluelos inoculados con sangre extraída 3 horas p.i.
B1, B2, B3	3 x 3	Polluelos inoculados con sangre extraída 6 horas p.i.
11, 12	2 x 4	Multiplicación de oocistos de dos muestras positivas (A2 y A3)
Patogenicidad	2 x 40	Patogenicidad del primer ciclo y de la cepa original

Ciclos posteriores

Para cada uno de los dos ciclos siguientes se utilizaron 15 pollos de engorde. Se inocularon seis polluelos donantes con oocistos esporulados de *E. acervulina* y se extrajo sangre de tres polluelos donantes a las 3 horas p.i. Cada muestra individual de sangre se utilizó para inocular otros tres polluelos, y los oocistos purificados a partir de todas las muestras de heces positivas se multiplicaron en polluelos SPF. Se determinó la patogenicidad y la inmunogenicidad de la cepa aislada multiplicada después del ciclo 3. A continuación se presentan los grupos y los números de polluelos.

Grupo	N.º de polluelos	Utilización
D	8	Polluelos donantes
A, B, C	3 x 3	Polluelos inoculados con sangre extraída 3 horas p.i.
I	2 x 4	Multiplicación (2X) de oocistos de las muestras positivas
Patogenicidad	2 x 40	Patogenicidad/inmunogenicidad del ciclo 3 y de la cepa original

1.1.2 Inóculos

E. acervulina se obtuvo originalmente del Laboratorio Veterinario Central, en Weybridge, Reino Unido, y se propagó por pases en el Servicio de Salud Animal, en Deventer, Holanda. Para el primer ciclo de esporozoítos extraintestinales se preparó una suspensión en solución salina que contenía 10^7 oocistos esporulados de *E. acervulina* por ml. Para los dos ciclos siguientes se prepararon suspensiones en solución salina que contenían 2×10^7 oocistos esporulados de *E. acervulina* por ml obtenidos tras la multiplicación del ciclo previo.

1.2 Métodos

1.2.1 Inoculaciones

Se inocularon polluelos donantes por vía oral en los alimentos con 10^7 (1.º ciclo) o 2×10^7 (ciclos siguientes) oocistos esporulados de *E. acervulina* en 1 ml de solución salina por polluelo a los 14 días de edad. Los polluelos fueron mantenidos sin comida durante 12 horas antes de la inoculación. Parte de los polluelos donantes se sacrificaron por hemorragia practicada mediante punción cardíaca, tres animales cada vez, a las 3 o 6 horas p.i. La sangre se recogió en tubos heparinizados de 10 ml, que contenían 15 U.I. de heparina de litio por ml de sangre (Sarstedt, Etten-Leur). Los polluelos fueron anestesiados por inyección intramuscular de xilazina (Rompun, 5 mg/kg de peso corporal) y ketamina (25 mg/kg de peso corporal), obtenida de AUV, Cuijck, Holanda.

Cada muestra individual de sangre se utilizó para inocular otros tres polluelos por vía oral en los alimentos con 3 ml de sangre heparinizada por polluelo a los 14 días de edad. Diez minutos después de la inoculación, las aves recibieron por vía oral 1 ml de una suspensión alcalina compuesta de 10 comprimidos de Rennie adquiridos en una farmacia normal, que contenían 680 mg de carbonato de calcio y 80 mg de carbonato de magnesio por comprimido, suspendidos en 20 ml de agua corriente.

1.2.2 Aislamiento de los oocistos

Las heces del resto de las aves donantes y de las aves inoculadas con sangre se recogieron por cada jaula y cada 24 horas en los días 3 a 6 o 7 p.i., y se hizo el recuento de los oocistos como se describe más adelante. Los oocistos se purificaban a partir de las heces recogidas si los recuentos de oocistos resultaban positivos utilizando una técnica de flotación en solución salina. Tras la purificación, los oocistos aislados se suspendieron en una solución de bicromato de potasio al 2% (p/v) y la suspensiones se insuflaron con burbujas de aire utilizando técnicas habituales empleadas en acuarios, durante 48 horas a 29°C, para provocar la esporulación de los oocistos. Después se procedió al recuento de los oocistos en la suspensiones.

Los oocistos esporulados se multiplicaron en cuatro aves SPF por muestra. A los seis días de edad, las aves SPF se inoculaban por vía oral con los alimentos empleando 3 ml de oocistos esporulados obtenidos de muestras de heces. Se recogieron las heces de las aves SPF de cada jaula en los días 4 a 6 p.i., y los oocistos se purificaron a partir de las heces y se contaron.

Para la multiplicación después del ciclo 1, las aves de los grupos 11 y 12 recibieron oocistos aislados a partir de las muestras de heces A2 y A3, que contenían 10.000 y 45.000 oocistos en total, respectivamente. Las cepas aisladas obtenidas después de los ciclos siguientes se multiplicaron dos veces debido al bajo número de oocistos en las cepas aisladas.

1.2.3 Recuento de oocistos en las heces

Se recogieron aproximadamente 25 muestras de heces recién depuestas por cada jaula, y un máximo de 100 g de heces se pesó, se suspendió en una solución de cloruro de sodio al 10% (p/v) (densidad = 1,1) y se mezcló hasta homogeneidad. Se mezclaron partes alícuotas de 1 ml de las heces suspendidas con 9 ml una solución saturada de cloruro de sodio. Los oocistos se contaron en muestras por triplicado de las heces suspendidas diluidas utilizando una cámara de recuento según lo descrito por Hawkley, y se calculó el número de oocistos por gramo de heces.

1.2.4 Patogenicidad

Se determinó la patogenicidad de los oocistos después de los ciclos 1 y 3, y se comparó con la patogenicidad de la cepa original utilizando 10 pollos de engorde por dosis y cuatro dosis por muestra. Se inocularon dosis de 10^3 , 10^4 , 10^5 y 10^6 oocistos esporulados por ave por vía oral a los 8 días de edad. Los polluelos se alojaron en grupos en jaulas. Se recogieron las heces de cada jaula en los días 4 a 6 o 7 p.i., y el recuento de oocistos en las heces se realizó como se ha descrito anteriormente. A los 6 días p.i. se sacrificaron las aves por electrocución. Se practicaron autopsias a todas las aves sacrificadas, y las lesiones en los intestinos se puntuaron con arreglo a lo descrito por Johnson y Reid (citado anteriormente).

Para la determinación de la patogenicidad de los oocistos recogidos después del ciclo 1, toda las aves fueron sacrificadas y pesadas a los 6 días p.i.. Para la determinación de la patogenicidad de los oocistos recogidos después de la propagación por pases número 3, se sacrificaron cinco aves de cada grupo a los 6 días p.i., y el resto de las aves se utilizaron para determinar la inmunogenicidad. Se recogieron las heces de cada jaula de 10 aves en los días 4 a 6, y de 5 aves de cada jaula en el día 7 p.i.

1.2.5 Inmunogenicidad

Se determinó la inmunogenicidad de los oocistos recogidos después del ciclo 3 y se comparó con la inmunogenicidad de la cepa original utilizando cinco pollos de engorde de cada grupo empleado para la determinación de la patogenicidad. Todas las aves se pesaron y se reinocularon por vía oral con 10^5 oocistos esporulados de la cepa original por cada ave a los 9 días p.i. Se recogieron las heces de cada jaula a los días 4 a 6 p.i., y los oocistos de las heces se contaron como se ha descrito anteriormente. A los 6 días después de la reinoculación se sacrificaron todas las aves por electrocución y se pesaron. Se practicaron autopsias a todas las aves y las lesiones de los intestinos se puntuaron como se ha descrito anteriormente.

2. Resultados

2.1 Aislamiento de los oocistos

Primer ciclo

No se encontraron oocistos en las heces de polluelos inoculados a los 3 días p.i. Se encontraron oocistos en las heces de aves inoculadas con sangre obtenida de aves donantes a las 3 horas p.i., en vez de en las heces de aves inoculadas con sangre obtenida a las 6 horas p.i. Todas las muestras de heces de los grupos A2 y A3 resultaron positivas para la presencia de oocistos a los 5 días p.i., y los oocistos se purificaron a partir de las heces de dichos grupos. Tras la esporulación, se obtuvieron las siguientes muestras:

Grupo	Oocistos/ml	Volumen total (ml)
A2	3.000	25
A3	15.000	25

Los oocistos recogidos de los grupos A2 y A3 se multiplicaron en aves SPF. Tras la multiplicación, los oocistos en las heces de aves que habían recibido oocistos aislados del grupo A2 se habían encogido y no estaba clara la viabilidad de dichos oocistos. A partir de las aves del grupo 12 que habían recibido oocistos aislados del grupo A3, se recogieron 500 ml que contenían 290.000 oocistos por ml, y se determinó la patogenicidad de dichos oocistos.

Segundo ciclo

Una muestra de heces del grupo C resultó positiva para la presencia de oocistos a los 5 y 6 días p.i., y los oocistos se purificaron a partir de las heces recogidas en dichos días. La cepa aislada denominada A3C2 contenía un menor número de oocistos, y los oocistos se multiplicaron en aves SPF. Tras la multiplicación, se recogieron 24×10^6 oocistos, y dichos oocistos se multiplicaron una vez más en aves SPF.

Tercer ciclo

Una muestra de heces del grupo A resultó positiva para la presencia de oocistos a los 5 días p.i., y los oocistos se purificaron a partir de las heces. La cepa aislada denominada A3C2A2 contenía un bajo número de oocistos, y los oocistos se multiplicaron dos veces en aves SPF. Tras la multiplicación, se recogieron los oocistos y se determinó la patogenicidad y la inmunogenicidad de dichos oocistos.

2.2 Patogenicidad

Se determinó la patogenicidad de los oocistos recogidos después de los ciclos 1 y 3. Los resultados se resumen en las Tablas 1 y 2. Después del ciclo 1 no se observaron diferencias claras en la media del peso corporal, puntuación media de lesiones o número de oocistos por gramo de heces.

TABLA 1

Patogenicidad después del primer ciclo

Dosis: (oocistos por ave) n=10	Patogenicidad de cepas de <i>E. acervulina</i>					
	Cepa aislada A3			Cepa original		
	Media del peso corporal (g)	Puntuación media de lesiones	N.º de oocistos por gramo de heces ($\times 10^3$)*	Media del peso corporal (g)	Puntuación media de lesiones	N.º de oocistos por gramo de heces ($\times 10^3$)*
10^3	428	1,0	480	425	0,9	150
10^4	414	2,1	1400	426	2,2	1500
10^5	391	2,9	2100	378	2,5	1300
10^6	332	3,1	528	350	3,1	920
*: Recogidos los días 4 a 6.						

Después del ciclo 3, las puntuaciones medias de lesiones fueron menores con oocistos del ciclo 3 que con oocistos de la cepa original tras dosis de 10^4 oocistos o más por ave. Sin embargo, no se observaron diferencias claras en el número de oocistos por gramo de heces en comparación con la cepa original. El número de oocistos estaba en conformidad con la dosis inoculada en ambos casos. El número de aves que habían recibido dosis mayores de la cepa aislada indica que dichas aves estaban considerablemente infectadas, pero que la puntuación de lesiones no aumentaba con la dosis inoculada.

ES 2 312 758 T3

TABLA 2

Patogenicidad después del tercer ciclo

Dosis: (oocistos por ave) n=5	Patogenicidad de cepas de <i>E. acervulina</i>					
	Cepa aislada A3C2A2			Cepa original		
	Media del peso corporal (g)	Puntuación media de lesiones	N.º de oocistos por gramo de heces (x10 ³)*	Media del peso corporal (g)	Puntuación media de lesiones	N.º de oocistos por gramo de heces (x10 ³)*
10 ³	No deter- minada	1,0	270	No deter- minada	1,2	110
10 ⁴	No deter- minada	1,6	710	No deter- minada	2,6	1800
10 ⁵	No deter- minada	1,0	510	No deter- minada	3,2	650
10 ⁶	No deter- minada	1,2	960	No deter- minada	3,5	910
*: Recogidos los días 4 a 7.						

2.3 Inmunogenicidad

Se determinó la inmunogenicidad de oocistos recogidos después del ciclo 3. Los resultados se resumen en la Tabla 3. En el grupo inoculado con 10³ oocistos por ave se observaron pocas lesiones. También se encontraron oocistos en las heces de dicho grupo. En los grupos inoculados con dosis mayores de la cepa aislada, no se observaron lesiones ni oocistos en las heces. Todos los grupos inoculados con dosis de 10⁴ oocistos, o más, por ave de la cepa aislada estaban protegidos contra la reinoculación con la cepa original. Estos resultados se contraponen a los del grupo testigo (a la derecha) que fueron reinoculados con la cepa original tras sobrevivir a la exposición con la cepa original.

TABLA 3

Inmunogenicidad después del tercer ciclo

Dosis: (oocistos por ave) n=5	Inmunogenicidad de cepas de <i>E. acervulina</i> tras la reinoculación					
	Cepa aislada A3C2A2			Cepa original		
	Media del creci- miento (g)*	Puntuación media de lesiones	Nº de oocistos por gramo de heces (x10 ³)**	Media del creci- miento (g)*	Puntuación media de lesiones	Nº de oocistos por gramo de heces (x10 ³)**
10 ³	356	0,25	260	304	0	169
10 ⁴	323	0	0	314	0	0
10 ⁵	335	0	0	342	0	0
10 ⁶	304	0	0	325	0	1
*: Tras la reinoculación; **: Recogidos los días 4 a 6.						

3. Discusión de los resultados

Tras la multiplicación, los oocistos en las heces de aves que habían recibido oocistos aislados después del primer ciclo del grupo A2 se habían encogido y no estaba clara la viabilidad de dichos oocistos. Este efecto puede deberse al tiempo que dichos oocistos habían estado expuestos a la solución saturada de sal durante la purificación. No se observaron desviaciones de los oocistos antes de la multiplicación.

El primer ciclo de oocistos extraintestinales de *E. acervulina* tuvo éxito con el grupo A3, pero la reproducibilidad y la patogenicidad de los oocistos aislados no fueron diferentes a las de la cepa original de *E. acervulina*.

El número de oocistos en las heces de aves que habían recibido las dosis superiores en el ciclo 3 de la cepa aislada indicaba que dichas aves estaban considerablemente infectadas. Sin embargo, la puntuación de las lesiones no aumentó con la dosis inoculada. Si la puntuación de las lesiones es un parámetro adecuado de la patogenicidad de la cepa, entonces la cepa aislada A3C2A2 es considerablemente menos patógena que la cepa original de *E. acervulina*.

Tras la reinoculación con la cepa original, las aves inoculadas con 10^3 oocistos de la cepa aislada A3C2A2 por ave mostraron pocas lesiones, y se encontraron oocistos en las heces de este grupo. Las aves inoculadas con dosis de 10^4 oocistos, o más, por ave de la cepa aislada A3C2A2 estaban protegidas contra la reinoculación con la cepa original.

Tablas

TABLA A1

Oocistos en las heces de aves donantes y aves inoculadas con sangre después del ciclo 1

Grupo	N.º de oocistos en cada cámara de recuento en las heces del día indicado p.i.											
	Día 3			Día 4			Día 5			Día 6		
D	40	40	40	330	330	330	250	250	250	50	50	50
A1	neg.	neg.	neg.	5	5	5	neg.	neg.	Pos.	neg.	neg.	pos.
A2	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	Pos.	neg.	neg.	pos.
A3	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	Pos.	pos.	pos.	pos.
B1	neg.	neg.	neg.	neg.	1	1	neg.	neg.	Neg.	neg.	neg.	neg.
B2	neg.	neg.	neg.	pos.	pos.	pos.	neg.	neg.	Pos.	neg.	neg.	neg.
B3	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Neg.	neg.	neg.	neg.

Tabla A2. Oocistos en las heces de aves donantes y aves inoculadas con sangre después del ciclo 2.

Grupo	N.º de oocistos en cada cámara de recuento en las heces del día indicado p.i.						
	Día 3	Día 4		Día 5		Día 6	Día 7
D	neg. pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	pos. pos.	pos. pos.
A	neg. neg.	neg. neg.	neg. neg.	neg. neg.	pos. pos.	neg. neg.	neg. neg.
B	neg. neg.	neg. neg.	neg. neg.	neg. neg.	neg. neg.	neg. neg.	neg. neg.
C	neg. neg.	neg. neg.	neg. neg.	neg. neg.	pos. pos.	neg. pos.	neg. neg.

ES 2 312 758 T3

TABLA A3

Oocistos en las heces de aves donantes y aves inoculadas con sangre después del ciclo 3

Grupo	N.º de oocistos en cada cámara de recuento en las heces del día indicado p.i.												
	Día 3	Día 4			Día 5			Día 6			Día 7		
D	no reali- zado	pos.	Pos.	pos.	pos.	pos.	pos.	Pos.	Pos.	pos.	pos.	pos.	pos.
A	no reali- zado	Neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	pos.	Neg.	Neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
B	no reali- zado	Neg.	neg.	pos.	neg.	neg.	neg.	Neg.	Neg.	neg.	neg.	neg.	neg.
C	no reali- zado	Neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	neg.	Neg.	Neg.	neg.	neg.	neg.	neg.

ES 2 312 758 T3

TABLA A4

Resultados individuales de la determinación de la patogenicidad después del primer ciclo

Grupo/ ave	Patogenicidad de cepas de <i>E. acervulina</i>			
	Cepa aislada del grupo A3		Cepa original	
	Peso corporal (g)	Puntuación de las lesiones	Peso corporal (g)	Puntuación de las lesiones
10³				
1	429	1	432	1
2	413	1	417	1
3	424	1	416	1
4	424	1	411	1
5	450	1	463	1
6	441	1	451	0
7	393	1	385	1
8	432	1	416	1
9	422	1	457	1
10	450	1	406	1
10⁴				
1	426	2	424	1
2	448	2	453	2
3	442	2	441	2
4	428	2	413	2
5	456	3	434	3
6	395	3	437	1
7	364	2	407	2
8	360	1	436	3
9	409	2	35	3
10	408	2	461	3
10⁵				
1	393	2	397	2
2	388	3	378	2
3	389	3	432	2
4	419	3	393	3
5	410	2	390	2
6	328	3	333	3
7	438	3	379	3
8	354	3	308	3
9	439	4	392	3
10	352	3	378	2
10⁶				
1	333	3	420	3
2	348	2	345	3
3	323	3	338	3
4	351	3	336	3
5	355	4	394	3
6	282	3	312	3
7	354	4	271	4
8	346	3	412	3
9	293	3	349	3
10	332	3	326	3

ES 2 312 758 T3

TABLA A5

Resultados individuales de la determinación de la patogenicidad después del tercer ciclo

Grupo/ ave	Patogenicidad de cepas de <i>E. acervulina</i>			
	Cepa aislada A3C2A2		Cepa original	
	Peso corporal (g)	Puntuación de las lesiones	Peso corporal (g)	Puntuación de las lesiones
10 ³				
1	No determinado	1,00	No determinado	1,00
2		1,00		1,00
3		1,00		2,00
4		1,00		1,00
5		1,00		1,00
10 ⁴				
1	No determinado	2,00	No determinado	4,00
2		2,00		3,00
3		1,00		2,00
4		2,00		2,00
5		1,00		2,00
10 ⁵				
1	No determinado	1,00	No determinado	4,00
2		1,00		3,00
3		1,00		4,00
4		1,00		3,00
5		1,00		2,00
10 ⁶				
1	No determinado	1,00	No determinado	4,00
2		1,00		4,00
3		1,00		3,00
4		2,00		3,00
5		1,00		No determinado

ES 2 312 758 T3

TABLA A6

Resultados individuales de la determinación de la inmunogenicidad después del tercer ciclo

Grupo/ ave	Inmunogenicidad de cepas de <i>E. acervulina</i>					
	Cepa aislada A3C2A2			Cepa original		
	Peso corporal (g)		Puntuación de las lesiones	Peso corporal (g)		Puntuación de las lesiones
	Antes de la reinoculación	6 días tras la reinoculación		Antes de la reinoculación	6 días tras la reinoculación	
10 ³						
1	594	912	0,00	644	953	0,00
2	620	1030	0,00	547	832	0,00
3	674	991	1,00	592	847	0,00
4	653	1031	0,00	635	970	0,00
5	No determinado	No determinado	No determinado	533	870	0,00
10 ⁴						
1	503	839	0,00	555	871	0,00
2	609	953	0,00	610	969	0,00
3	551	859	0,00	579	852	0,00
4	513	798	0,00	624	942	0,00
5	550	890	0,00	480	782	0,00
10 ⁵						
1	588	1013	0,00	580	951	0,00
2	548	919	0,00	584	953	0,00
3	420	696	0,00	557	903	0,00
4	403	670	0,00	539	884	0,00
5	560	897	0,00	498	778	0,00
10 ⁶						
1	482	791	0,00	568	928	0,00
2	470	789	0,00	512	856	0,00
3	495	819	0,00	552	858	0,00
4	498	719	0,00	440	709	0,00
5	471	818	0,00	485	803	0,00

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para preparar oocistos no patógenos de una especie de *Eimeria* capaces de generar una respuesta inmunitaria contra la coccidiosis en aves de corral, en el que dicho procedimiento comprende la atenuación de una cepa de una especie de *Eimeria* mediante pasadas en serie de dicha cepa por lo menos nueve veces en aves SPF, y en el que dicho procedimiento comprende las etapas siguientes:

- 10 (i) inocular por lo menos un ave exenta de patógenos específicos (SPF) con oocistos de *Eimeria*;
- (ii) extraer sangre del ave de la etapa (i);
- (iii) inocular por lo menos una segunda ave SPF con sangre de la etapa (ii);
- 15 (iv) recoger oocistos de *Eimeria* de un ave de la etapa (iii);
- (v) multiplicar los oocistos recogidos en la etapa (iv) en por lo menos otra ave SPF, y extraer oocistos de la misma;

20 en el que las etapas (i) a (v) representan un ciclo que se repite por lo menos tres veces siendo los oocistos recogidos en la etapa (v) de cada ciclo, utilizados en la inoculación de la etapa (i) del siguiente ciclo.

25 2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que dicha cepa se selecciona de entre la especie *Eimeria acervulina*.

3 3. Procedimiento de preparación de una vacuna que comprende la preparación de oocistos según la reivindicación 1 ó 2, y la formulación con un excipiente farmacéuticamente aceptable.

30 4. Cepa A3C2A2 de *Eimeria acervulina* depositada en la Colección Europea de Cultivos Celulares con el número de acceso 02010911.

5. Utilización de oocistos de la cepa según la reivindicación 4 en la preparación de una vacuna destinada a la protección de aves de corral contra la coccidiosis.

35 6. Utilización según la reivindicación 5, en la que el método de protección comprende administrar por lo menos 10^4 oocistos según la reivindicación 4.

40

45

50

55

60

65