

419996



P.- 55.761

419996

MEBUS  
CASE 1-2-SPAIN

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

PATENTE DE INVENCION

en ESPAÑA

*F.C. 17-3-76*

por VEINTE años

*Inv. Cl. C12k, A61k*

A nombre de THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF NEBRASKA

entidad norteamericana

establecida en Lincoln, Nebraska, 68503, Estados Unidos  
de América

por: "UN PROCEDIMIENTO PARA ATENUAR UN VIRUS DE DIARREA  
DE TERNEROS"

(Clase Internacional C12k, A61k)

419996



La presente invención se refiere a una vacuna  
contra un nuevo agente tipo virus corona que es un  
factor causante en la diarrea neonatal de terneros, y  
a un método para obtener dicha vacuna. En particular,  
5 la invención consiste en un método para atenuar el vi-  
rus tipo virus corona por paso en serie en células de  
riñón de vacuno fetal, y a la vacuna así obtenida.  
Además, se prepara una vacuna desactivando el agente  
tipo virus corona tras haber sido propagado en culti-  
10 vos en células.

Fundamentos e identificación del agente tipo virus  
corona

Los factores etiológicos de la diarrea neona-  
tal de terneros (DNT) son complejos. Numerosos organis-  
15 mos han sido implicados como causas de esta enferme-  
dad, incluyendo bacterias, hongos, micoplasma, clami-  
dia y virus. Algunos virus específicamente enumerados  
han sido la diarrea viral bovina, rinotraqueitis bovi-  
na infecciosa, adenovirus, enterovirus y virus de Ha-  
den. Otros virus que han sido señalados como agentes  
20 etiológicos de la DNT son el virus de la enteritis  
neumonía de terneros y un agente tipo reovirus denomi-  
nado virus DNT. El método para preparar una vacuna  
eficaz contra este agente tipo reovirus de la DNT es-  
25 tá descrito y reivindicado en la solicitud de patente

8.12.73

419996



de EE.UU. Nº de serie 197.520, presentada el 10 de noviembre de 1.971.

5 Em el curso de ensayos en campo de la vacuna preparada a partir del agente tipo reovirus se observó que en ciertos rebaños en el oeste de Nebraska se producía un control inadecuado de la enfermedad de los terneros. (Vet. Med./Small Anim. Clin., 67(2), 173 (1972)). Típicamente, los terneros habían recibido la vacuna durante las primeras 24 horas de vida, 10 y sin embargo las diarreas se desarrollaron en varios rebaños cuando los terneros tenían de 5 a 20 días de edad. Las heces diarreicas de estos terneros fueron examinadas para determinar el virus tipo reovirus, usando la técnica de anticuerpo fluorescente, y se hallaron negativas. 15

Las heces diarreicas de uno de los rebaños vacunados en el que el 90 por ciento de los terneros fueron afectados cuando tenían 7-12 días de edad fueron inculadas por inyección duodenal en un ternero 20 privado de calostros y nacido por cesárea. Este ternero desarrolló diarrea de la que se prepararon filtrados fecales exentos de bacterias que fueron inculados oralmente en terneros gnotobióticos. Estos terneros desarrollaron diarrea, indicando así a otro agente 25 viral como causa de la diarrea. El examen al microscopio

8.12.73

419996



pio electrónico de las heces diarreicas de los terneros experimentales reveló un agente tipo virus corona. Se hallaron partículas virales similares en las heces diarreicas tanto de rebaños vacunados que participaban en los ensayos en campo como de rebaños en los que no se había usado vacuna.

Este nuevo agente tipo virus corona ha sido ahora purificado e identificado en mayor detalle. Se ha descubierto que este virus tipo corona puede ser propagado y modificado en cultivos de células hasta formar una vacuna eficaz. También se ha descubierto que se puede preparar una vacuna eficaz desactivando el virus tras haberle hecho crecer en cultivos de células. Por tanto, la presente invención consiste en vacunas eficaces contra este nuevo agente tipo virus corona, y en métodos para preparar y administrar esta vacuna. La purificación y descripción de este agente están ahora descritas en Am. J. Vet. Res. 33, 1147-56 (1972).

Purificación del agente tipo virus corona

Se recogieron muestras de material fecal de terneros diarreicos en 19 rebaños de ranchos en el oeste de Nebraska. Los terneros de 12 de los 19 rebaños habían sido inoculados previamente por vía oral con vacuna de virus tipo reovirus DNT, mientras que los

419996



5        terneros de los rebaños restantes estaban sin vacunar. Los frotis fecales de terneros diarreicos fueron teñidos con un conjugado inmunofluorescente, para ensayar el virus DNT (Univ. de Nebraska, Agri. Exper. Sta. Res. Bull. 233, 1969), y solo se usaron las muestras negativas al virus DNT. El material fecal diarreico recogido de terneros con infección natural en el campo, y de terneros infectados experimentalmente, fue congelado inmediatamente y almacenado a  $-20$  a  $-60^{\circ}\text{C}$  hasta que se  
10        empezó la purificación viral.

      Se prepararon gradientes de densidad de sacarosa, que se dejaron reposar durante la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  para formar un gradiente lineal antes del uso. Los gradientes consistían en 8 ml de cada uno de 400, 300, 200  
15        y 100 mg de sacarosa por mililitro de agua destilada desionizada. Las concentraciones en disminución fueron dispuestas en capas en tubos de centrífuga de nitrato de celulosa, de 2,5 por 8,9 cm.

      Todos los métodos que conducen a la purificación viral fueron efectuados a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se usaron una centrífuga clínica y una ultracentrífuga.  
20

      El material fecal diarreico fue mezclado con tres volúmenes de agua desionizada y centrifugado a 5000 g durante 30 minutos. El material sobrenadante  
25        fue centrifugado luego durante tres horas a 25.000 rpm

8.12.73

419996



en un rotor tipo 30. El gránulo resultante fue dispersado por sonicación durante 30 segundos en solución de sacarosa al 5% (peso/volumen) . Esta suspensión será denominada suspensión viral cruda.

5                   La suspensión viral cruda (5 ml) fue dispuesta en capa sobre los gradientes en los tubos, y se centrifugó a 25.000 rpm durante 2 horas en un rotor SW 27. Tras la centrifugación se localizaron las bandas por dispersión de la luz. El material de cada banda fue recogido desde la parte superior del tubo de centrifuga,  
10                   usando una pipeta Pasteur provista de una propipeta. Las muestras fueron dializadas contra solución de acetato amónico al 1%, antes de efectuar la microscopía electrónica. La fracción que contiene virus (virus semipurificado de la banda que estaba a 6 cm del menisco) fue  
15                   sometida a más purificación por centrifugación con gradiente de densidad de sacarosa o por centrifugación con gradiente de cloruro de cesio (CsCl).

                  La preparación de virus semipurificada fue  
20                   purificada adicionalmente repitiendo el procedimiento de centrifugación con gradiente de densidad de sacarosa antes descrito. De nuevo, se localizaron las bandas y la banda a 6,0 cm del menisco fue recogida y dializada contra acetato amónico al 1%, para producir un virus  
25                   purificado.

419996



Se efectuaron centrifugaciones con gradiente isopícnico de la preparación de virus semipurificada, con CsCl, partiendo de una solución al 30% (15 g de CsCl más 35 ml de agua desionizada). Esta solución (4  
5 ml) fue puesta en tubos de centrífuga de nitrato de celulosa, y en cada tubo se depositó una capa superior con 1,4 ml de suspensión viral. Se usó un rotor SW 65 a 60.000 rpm durante 18 horas, tiempo en que se había alcanzado un equilibrio aparente. El índice de refracción del CsCl en la zona en que se localizó el virus  
10 fue determinado usando un medidor TS. La banda a 2,9 cm del menisco fue recogida y dializada contra solución de acetato amónico al 1%, dando un virus purificado.

La suspensión viral cruda antes mencionada  
15 (15 ml) fue también fraccionada por filtración en gel, en una columna de 4,2 por 42 cm de gel (Sepharose 2B, Pharmacia Fine Chemicals, Inc., Piscataway, N.J.). La columna había sido equilibrada previamente con NaCl al 0,9%, y fue revelada con esta solución salina. Se usó  
20 un caudal de 6,0 ml/hora. Se recogieron fracciones de 5 ml, y la absorbancia fue determinada a 260  $\mu$ m con un espectrofotómetro. Los materiales de cada uno de los diferentes picos fueron combinados y concentrados separadamente por ultrafiltración.

25 También se usó un método simplificado para la

419996



preparación de virus a partir de material fecal diarréico procedente de terneros experimentales. El material fecal fue centrifugado directamente a 3.400 g durante 30 minutos. Una porción del material sobrenadante fue sometida a extracción dos veces con diclorodifluorometano. La fase acuosa (5 ml) y el material sobrenadante (5 ml) sin tratar fueron sometidos a centrifugación con gradiente de densidad de sacarosa, como se ha descrito antes.

10 El virus concentrado por centrifugación con gradiente de densidad fue usado para estudios con microscopio electrónico, y también como antígeno para inmunización de conejos, para preparar un conjugado para análisis inmunofluorescente. Unos conejos domésticos  
15 blancos de aproximadamente 6 meses de edad fueron sangrados del corazón (14 ml) y sometidos luego a inyección intramuscular en cuatro puntos, con 0,25 ml por punto de una mezcla de 0,4 ml de antígeno y 0,6 ml de coadyuvante de Freund completo. Cinco semanas tras la  
20 inoculación se recogieron 70 ml de sangre por punción cardíaca. Se preparó gamma globulina marcada con fluoresceína, a partir del suero post inoculación, por métodos conocidos (Proc. U.S. Livestock San. Assn., Oct. 1968, 139-144).

25 La presencia del agente tipo virus corona pudo

419996



ser detectada en el intestino infectado por la técnica inmunofluorescente usando el conjugado antes preparado. La especificidad de este conjugado para el agente tipo virus corona fue claramente mostrada en la siguiente serie de ensayos. Unas secciones de intestino de terneros diarreicos que habían sido infectados con agente tipo virus corona fueron teñidas con el conjugado, y se observó la fluorescencia de las células vellosas. El intestino del mismo ternero no tenía fluorescencia cuando fue teñido con el conjugado del agente tipo reovirus antes mencionado. Unas secciones de intestino de terneros diarreicos que habían sido infectados con el virus tipo reovirus fueron positivas cuando fueron teñidas con el conjugado del agente tipo reovirus, y negativas cuando fueron teñidas con el conjugado del agente tipo virus corona. Unas secciones de intestino de ternero gnotobiótico normal no tenían fluorescencia cuando fueron teñidas con el conjugado del agente tipo virus corona. Unas secciones de un intestino de ternero gnotobiótico normal no tenían fluorescencia cuando fueron teñidas con el conjugado del agente tipo virus corona.

#### Morfología del virus

La banda que contiene virus, resultante de la purificación por ultracentrifugación con densidad

419996



en gradiente, fue examinada por examen al microscopio electrónico. Unas gotitas de las bandas fueron aplicadas a rejillas de cobre de 74 micras de abertura que habían sido previamente revestidas con colodión y reforzadas con carbono evaporado. Se dejó que las gotitas permaneciesen sobre las rejillas durante 3 a 25 minutos, dependiendo del grado de dispersión de luz de la banda que se estuviese estudiando. El exceso de fluido fue absorbido con papel de filtro, y luego se aplicó a la rejilla una gotita de solución de ácido vanadatolibdatofosfowolfrámico. Se dejó que la mancha permaneciese sobre la rejilla durante 1 a 1,5 minutos antes de eliminar el exceso usando un papel de filtro como secante.

Las muestras fueron examinadas con un microscopio electrónico, con unos aumentos en el instrumento de 32.000 o mayores. Las determinaciones de tamaño se hicieron por análisis dimensional de las micrografías electrónicas de las muestras, y duplicados de retícula de difracción que fueron tomados inmediatamente después de las micrografías electrónicas de la muestra, sin alterar los calibrados del instrumento.

El tamaño de las partículas virales completas estaba comprendido entre 107 y 160  $\mu$ m en la misma micrografía, y tenían proyecciones superficiales si-

419996



milares a las observadas para los virus corona. El tamaño medio de las partículas, incluyendo las proyecciones superficiales, según se determinó por microscopía electrónica, era  $126 \mu\text{m}$ . El nucleocápsido era polimórfico, y variaba en tamaño y forma entre redondo y oblongo. Las envoltentes de los nucleocápsidos eran particularmente evidentes cuando se perdieron los cilios. La anchura de los cilios era variable hasta un máximo de  $23 \mu\text{m}$ . Las proyecciones superficiales de partículas bien conservadas tenían forma de pétalo unido a la partícula por un tallo fino, y una media de  $11 \mu\text{m}$  de longitud.

El agente tipo virus corona descrito en la invención se diferencia fácilmente, en base a tamaño y características morfológicas, de otros virus que han resultado ser, o de los que se ha propuesto que son, un factor etiológico en la diarrea neonatal de terneros. El agente tipo virus corona aquí descrito tiene características morfológicas diferentes, y es mayor que los enterovirus, virus de la neumonía-enteritis de terneros, diarrea viral bovina, virus de diarrea neonatal de terneros (tipo reo), y virus de Haden. Este nuevo agente es más pequeño, y le faltan las características morfológicas típicas del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina. La densidad

8.12.73

419996



de flotación del agente tipo virus corona purificado era 1,24 usando CsCl, mientras que el agente tipo reovirus tenía una densidad de flotación de 1,359 (Can. J. Comp. Med., 35 (1971)).

5                    Los efectos fisiológicos del agente tipo virus corona también difieren de los del virus tipo reo. El periodo de incubación tras inoculación oral de terneros gnotobióticos con el agente tipo reovirus puede ser tan corto como 13,5 a 14 horas, mientras  
10                    que el más corto periodo de incubación observado con el agente tipo virus corona era 18 horas. Además, los terneros gnotobióticos infectados con reovirus tienen diarrea durante 5 a 8 horas, y luego parecen normales 24 horas después de la iniciación de la diarrea. Por  
15                    otra parte, los terneros gnotobióticos infectados con agente tipo virus corona desarrollan diarrea y pueden continuar teniendo diarrea 5 o más días, o pueden morir 2-3 días después de empezar la diarrea.

Preparación y uso de la vacuna

20                    La siguiente descripción ilustra métodos útiles para efectuar la invención; sin embargo, se ha de entender que estos no son limitativos.

                    El agente tipo virus corona obtenido de terneros infectados y aquí descrito fue propagado en células de riñón de bovino fetal. El virus puede ser pro-  
25

419996

14



pagado también en células de otros tejidos, o líneas de células de origen bovino u otro. Los cultivos de células en capa única son preparados por métodos conocidos e inoculados con el agente tipo virus corona.

5 En general, los cultivos en capa única son lavados con solución salina equilibrada de Hanks, y luego se añade un inóculo viral y se deja que sea absorbido durante varias horas, en general 2 horas, a aproximadamente 37°C. Se añade un medio de mantenimiento

10 de solución salina equilibrada de Earle, que contiene 0,5% de hidrolizado de lactalbúmina (HLA), y 0,1% de extracto de levadura, y se añaden 100 unidades de penicilina y 200 µg de estreptomina por mililitro, y se incuba el cultivo a 30-40°C, preferiblemente a

15 aproximadamente 37°C, durante 2-10 días. El virus es recogido, por ejemplo separando de las células por vertido el fluido que sobrenada. El inóculo viral pueden ser heces recogidas de terneros infectados por virus corona o fluidos de cultivo de cultivos de vi-

20 rus tipo virus corona. Las heces pueden ser usadas según se recogen, o pueden ser diluídas en solución salina tamponada con fosfato (pH 7,2), y centrifugadas a 1000 g durante 20 minutos, usando como inóculo el fluido que sobrenada.

25 Se pueden usar otros medios de mantenimiento,

8.12.73

419996



por ejemplo medio de Eagle modificado, que contiene hidrolizado de lactalbúmina. La elección del medio forma parte de la habilidad normal de la técnica.

5 Se obtiene una vacuna eficaz de virus tipo corona atenuados haciendo pasar virus purificado por células de riñón bovino fetal un número suficiente de veces, de manera que cuando un ternero inoculado sea enfrentado con virus virulentos no se produzca enfermedad. Generalmente se necesitará hacer pasar el  
10 virus de 5 a 60 veces, siendo los pasos en células primarias o secundarias (células primarias por las que se ha pasado una vez), o células o líneas de células que han experimentado más pasos. Las células que han experimentado más pasos, por las que se ha pasado más de 10 veces, pueden ser consideradas líneas  
15 de células. Un método preferido implica una combinación de pasos por células primarias o secundarias y células o líneas de células que han experimentado más pasos. Los títulos de virus se determinan por métodos  
20 típicos. Por ejemplo, las células inoculadas con diluciones de virus son incubadas durante 5 días en tubos que contienen células de riñón bovino fetal. La presencia de virus se determina, por ejemplo, por efectos citopatológicos, inmunofluorescencia o hemadsorción.  
25 Más específicamente, se produjo por el si-

8.12.73

419996



guiente método una vacuna atenuada eficaz. Se obtuvo un feto bovino y se preparó gran cantidad de células de riñón primarias. A partir de las células primarias se prepararon varios cultivos en botella y cubreobjetos, y el resto de las células primarias fue congelado usando solución salina equilibrada de Earle que contenía 0,5% de HLA, 10% de suero de bovino adulto y 10% de sulfóxido de dimetilo. Los cultivos en botella y en cubreobjetos fueron inoculados con solución que contiene virus, según se describe aquí, y fueron incubados a 37°C. Cuando se observaron unas pocas células fluorescentes en los cultivos en cubreobjetos, algunas células primarias congeladas del mismo feto fueron descongeladas y propagadas en cultivos de capa única por métodos típicos. El fluido del cultivo de células primarias infectadas fue pasado a estos cultivos de células secundarias. Tras incubación durante 6-7 días se usó fluido del cultivo de células secundarias para inocular cultivos adicionales de células secundarias. Desde el paso 1º hasta el 15º se usaron 2 ml del fluido para inocular una botella de 226 gramos, según se ha descrito antes. Desde el paso 15º al 25º se añadieron 2 ml del fluido al medio de mantenimiento en la botella. Tras el paso 25º se añade un inóculo de 1 ml del medio de mantenimiento de cada botella. Cuando el agente

8.12.73

419996



tipo virus corona hubo alcanzado el paso 5<sup>o</sup> a 20<sup>o</sup>  
de cultivo en tejidos se inició una serie de pasos  
consecutivos de células procedentes de células se-  
cundarias. En cada paso del virus solo se infectó una  
5 parte de las células, y las otras células sin infec-  
tar fueron subcultivadas para convertirse en el si-  
guiente nivel de paso superior de células. Este tipo  
de cultivo de células se denomina cultivo de células  
con pasos. Continuando los pasos de subcultivo conse-  
10 cutivos del virus en cultivos de células con pasos  
se derivó un sistema compatible de células-virus.  
Tras 5-20 pasos del virus en cultivos de células se-  
cundarias, el virus fue pasado 5-40 o más veces en  
cultivos de células con pasos, para producir una va-  
15 cuna eficaz de virus tipo virus corona atenuados. El  
periodo de incubación para los pasos virales disminu-  
ye al aumentar el número de pasos, y puede ser de 2  
a 7 días para pasos en células o líneas de células con  
más pasos. Cada paso se efectúa hasta que se obtenga  
20 un efecto citopatogénico. La vacuna puede ser produci-  
da en una línea de células de riñón bovino fetal, o  
a partir de otros tejidos o líneas de células de ori-  
gen bovino u otro, por ejemplo pulmón bovino, una lí-  
nea de células turbinadas bovinas, o células o líneas  
25 de células de riñón de porcino, haciéndolas desarrollar



# 419996

en el cultivo de tejido a aproximadamente 37°C hasta que se obtiene un título de virus adecuado, y recogiendo luego el virus. Se obtienen títulos de  $10^2$  a  $10^{6,5}$ , preferiblemente de  $10^4$  a  $10^6$ . La vacuna puede ser usada en estado líquido o liofilizada. Puede ser reconstituída con diluyente estéril, tal como agua destilada, para uso posterior.

El producto preferido consiste en un virus atenuado que ha sido pasado 12 veces por células secundarias y 15 veces por células que, a su vez, han sido pasadas 9 a 27 veces. Así, el nivel total de pasos fue 27. Se han preparado vacunas de hasta 35 pasos.

Además, se prepara una vacuna desactivada eficaz desactivando el agente tipo virus corona. En general, esta se prepara propagando primero el agente en células de riñón de bovino fetal, según se ha descrito antes, hasta que se obtenga un título adecuado. El título debe ser lo mayor posible dentro del intervalo antes indicado. Se puede usar cualquier nivel de paso por células del virus, incluso virus sin atenuar. Luego se desactiva el virus tratándolo a 20-40°C con un agente desactivador conocido en la técnica, tal como formalina,  $\beta$ -propiolactona, radiación ultravioleta, o calor, durante un periodo de tiempo y concentración



# 419996

de agente desactivador que desactiven eficazmente al virus. Estos detalles son bien conocidos en la técnica. Se puede añadir un coadyuvante para reforzar el carácter antigénico. El coadyuvante puede ser cualquiera  
5 de los conocidos en la técnica, incluyendo gel de hidróxido de aluminio, alumbre potásico, alginato, o una base de aceite u otro coadyuvante, tal como aceite mineral u otro orgánico.

El siguiente es un método típico para preparar una vacuna desactivada. Se usa el agente tipo virus corona al nivel del 27º paso, según se ha descrito antes. Se añade formalina a los fluidos de cultivo que contienen virus, hasta que se obtiene una concentración del 0,2%. Luego se dejan reposar estos fluidos durante  
10 1 a 2 días a 37°C. Se añade gel de hidróxido de aluminio como coadyuvante al virus desactivado, hasta una concentración del 10%. Se ajusta el pH a aproximadamente 7,2 con hidróxido de aluminio.

La vacuna atenuada puede ser administrada oralmente en dosis de 1 a 5 ml, que contienen  $10^2$  a  $10^{6,5}$  TCID/ml, a terneros preferiblemente recién nacidos, para inducir la inmunidad a los virus virulentos. La vacuna desactivada es administrada parenteralmente en dosis de 1 a 5 ml, a vacas preñadas, 30-90 días antes de dar  
20 a luz, o a terneros en edad temprana, lo más pronto posi  
25



419996

ble después del nacimiento, para proporcionar protección ante el agente tipo virus corona.

Además, una vacuna en combinación puede comprender virus corona y cualquier otro agente viral, preferiblemente desactivado, usado para inmunizar terneros o vacas. En una combinación preferida se incluyen virus corona y reovirus desactivados, preparándose tanto uno como otro desactivando un virus vivo, ya esté sin atenuar o atenuado, mediante productos químicos, radiación o calor. También se puede combinar el virus corona con adenovirus bovino, virus de diarrea bovina u otros patógenos bovinos tales como E. coli o clostridia sp.

Se prepara una vacuna en combinación, que contiene virus corona y reovirus, mezclando cantidades iguales de ambos agentes desactivados. Luego se añade formalina hasta una concentración de 0,2% y gel de hidróxido de aluminio hasta 10% en volumen. La dosis de esta vacuna es 1 a 5 ml, administrados parenteralmente a la vaca preñada. Las combinaciones pueden ser administradas a terneras o vacas preñadas. Las vacunas en combinación proporcionan protección para el ternero recién nacido, por los anticuerpos de calostros y/o de leche. Además, se puede desarrollar una protección contra ambos agentes inmunizando a la vaca preñada.

419996



con la vacuna tipo reovirus desactivado, y administrando luego al ternero la vacuna tipo virus corona atenuado. También se puede obtener protección contra ambos agentes inmunizando a la vaca preñada con la  
5 vacuna tipo virus corona desactivado, y administrando luego al ternero la vacuna tipo reovirus atenuado. Finalmente, se puede administrar a la vaca preñada una vacuna de combinación que comprenda agentes atenuados tipo virus corona y reovirus.

10 Se ensayó la eficacia de la vacuna de virus atenuados administrando la vacuna, producida a diversos niveles de paso por cultivo de células, a terneros gnotobióticos de aproximadamente 7 horas de edad. En tiempo posterior los terneros fueron sometidos a inoculación con virus virulentos. Los resultados de estos ensayos se resumen en la Tabla 1.  
15

El ternero 1, inoculado por vía oral con 10 ml de fluido de cultivo de células del 14º paso del virus en células secundarias de riñón de bovino fetal, desarrolló diarrea y se recuperó. A los 9 días de edad, el ternero fue inoculado por vía oral con  
20 10 ml de heces diarreicas (virus virulento) en 20 ml de PBS, y permaneció normal. El ternero 2, inoculado con 10 ml de paso 15º de virus en riñón de bovino fetal secundario, no desarrolló diarrea y permaneció  
25



419996

normal después de haberle administrado un inóculo de contaminación de virus virulento. Los terneros 3 y 4, inoculados con 10 ml de virus de paso 16<sup>o</sup>, crecido en células secundarias de riñón de bovino fetal, desarrollaron diarrea suave. El ternero 3 fue sacrificado poco después de la iniciación de la diarrea; unas secciones del intestino delgado y del colon, teñidas con conjugado del agente tipo virus corona, tenían inmunofluorescencia en el epitelio de los vellos intestinales y colon. El ternero 4, inoculado con virus virulento en heces diarreicas cuando tenía 6 días de edad, permaneció normal. El ternero 6, inoculado por vía oral con 5 ml de virus de paso 19<sup>o</sup>, crecido en células secundarias de riñón de bovino fetal, desarrolló diarrea. Doce terneros (n<sup>o</sup> 7 a 13 y 15 a 19) inoculados por vía oral con 5 ml de virus de paso 13<sup>o</sup> a 25<sup>o</sup>, de los que al menos 5 pasos fueron en pasos superiores de células de bovino fetal, no desarrollaron diarrea, y salvo el ternero 18 permanecieron normales después de inoculación oral con heces que contienen virus virulento.

Una vacuna de combinación que contiene virus corona y reovirus desactivados fue evaluada en terneros adultos de 2 ranchos. La vacuna fue preparada con virus corona de paso 27, desactivado con formalina, y

8.12.73

419996



reovirus (línea de células de riñón de bovino primarias y de riñón de bovino) de paso 201, desactivado con formalina. Los virus desactivados fueron mezclados entre sí en cantidades iguales, y se añadió gel de hidróxido de aluminio hasta 10%.

5

Tabla 1<sup>a</sup>

Ternero n <sup>o</sup>	N <sup>o</sup> de pasos del virus <sup>b</sup>	Resultado de la inoculación con virus	Resultado de la inoculación contaminante	Edad del ternero (días)
1	14 + 0	D	N	9
2	15 + 0	N	N	3
3	16 + 0	d	Muerto	-
4	16 + 0	d	N	6
5	Control de virus contaminante	-	D	3
6	19 + 0	D	No enfrentado	-
7	5 + 8	N	N	4
8	6 + 7	N	N	3
9	9 + 5	N	N	3
10	8 + 9	N	N	3
11	9 + 7	N	N	3
12	11 + 8	N	N	4
13	11 + 9	N	N	5
14	Control de virus contaminante	-	D	3
15	11 + 11	N	N	4
16	10 + 11	N	N	3
17	10 + 12	N	N	3
18	10 + 15	N	d	4
19	10 + 13	N	N	4



<sup>a</sup> D = diarrea; N = normal

<sup>b</sup> Pasos en células primarias o secundarias, y pasos en células que habían experimentado más de dos pasos.

TABLA 2

	<u>Nº de vacas</u>	<u>Nº de terneros tratados de diarrea</u>	<u>% tra- tado</u>
Rancho Nº 1	242 vacunadas dos veces	3	1%
	85 no vacunadas	77	91%
Rancho Nº 2 (a)	600 vacunadas dos veces (400 nacidas en establo en que se halló infec- ción bacteriana; 200 na- cidas fuera del establo)	104	26%
	(b) 350 vacunadas una vez	17	5%
	1300 no vacunadas	195	15%
	(c) 750 vacunadas dos veces	7	1%
(d)	250 vacunadas dos veces	3	1%
	250 no vacunadas	25	10%

La presente solicitud que corresponde a la presentada en Estados Unidos de América, con fecha 30 de Octubre de 1.972, bajo el Número 302.179, se acoge a los beneficios del Artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

20

25

8.12.73

419996



- REIVINDICACIONES -

5

Los puntos de invención propia y nueva que se presentan para que sean objeto de esta solicitud de Patente de Invención en España por VEINTE años, son los que se recogen en las reivindicaciones siguientes:

10

1ª.- Un procedimiento para atenuar un virus de diarrea de terneros tipo virus corona, que comprende pasar dicho virus de 5 a aproximadamente 60 veces en un cultivo de tejidos que soporta el crecimiento del virus, hasta que el virus, cuando es inoculado en terneros recién nacidos, evita el desarrollo de enfermedad tras posterior enfrentamiento con virus virulento.

15

2ª.- Un procedimiento según la reivindicación 1ª, donde los pasos son en un cultivo de tejido de células de riñón de bovino fetal a 30-40°C.

20

3ª.- Un procedimiento según la reivindicación 2ª, donde los pasos totales son 10-40, de los cuales 5-10 pasos son en cultivos de células de riñón de bovino fetal primeras o secundarias, y los restantes son en cultivos

25

22-12-75

- 24 -

419996

29 DIC.



de células de riñón de bovino fetal pasadas más veces.

4ª.- Un procedimiento para atenuar un virus de diarrea de terneros.

5 Tal y como se ha descrito en la Memoria que antecede y para los fines que se han especificado.

Esta Memoria consta de veinticinco hojas escritas a máquina por una sola cara.

Madrid,  
P.A.

29 DIC. 1975

Alberto de Elorza  
Por Poder.

22-12-75  
VGD.

- 25 -