

MINISTERIO DE INDUSTRIA  
REGISTRO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL



ESPAÑA

⑩ ES	⑪ NUMERO	458.113	⑬ A 1
	⑫ FECHA DE PRESENTACION	22-4-1977	

PATENTE DE INVENCION

⑩ PRIORIDADES:	⑫ FECHA	⑬ PAIS
⑪ NUMERO		
679.840	23-4-76	EE.UU.

⑭ FECHA DE PUBLICIDAD	⑮ CLASIFICACION INTERNACIONAL	⑯ PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
	C12K	

⑰ TITULO DE LA INVENCION
"UN PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UN VIRUS VIVO DE HERPES DE RINCNEUMONITIS EQUINA"

⑱ SOLICITANTE (S)
PHILIPS ROXANE INC. (PHA 20775)

DOMICILIO DEL SOLICITANTE
2621 North Belt Highway, St. Joseph, Missouri 64502, Estados Unidos de América

⑲ INVENTOR (ES)
Charles William Purdy

⑳ TITULAR (ES)

㉑ REPRESENTANTE
DON FERNANDO DE ELZABURU MARQUEZ (P-65.788)

P.- 65.788

1           La presente invención se refiere a una vacuna para la protección de équidos frente a los efectos de la rinoneumonitis equina, a un método para preparar la vacuna, y a un método para proteger con ella a los équidos.

5           En breve, la invención comprende las etapas de atenuar una cepa virulenta del virus de RNE por paso a través de una línea de células Vero a temperatura reducida, con un cierto número de pasos en serie, suficiente para reducir la virulencia del virus sin afectar a su carácter inmunógeno.

10

          La rinoneumonitis es una infección viral aguda que se cree causada por el virus del herpes equino tipo I, y está caracterizada por fiebre, leucopenia e inflamación catarral del conducto respiratorio. La enfermedad viral predispone a infección bacteriana secundaria, que afecta a diversas partes del conducto respiratorio. Cuando están infectadas yeguas preñadas, el aborto es normalmente una secuela.

15

          La rinoneumonitis tiene lugar en granjas, en áreas de cría concentrada de caballos. Se observa una pauta relativamente uniforme en el centro de Kentucky, donde se han estudiado tanto la enfermedad respiratoria como el aborto. La enfermedad respiratoria se observa casi exclusivamente en los caballos jóvenes, ya sea en granjas o cuando se reúnen para venta o entrenamiento. La mayoría de las granjas del área tienen brotes de rinoneumonitis en otoño o al principio del invierno, especialmente en octubre, noviembre y diciembre. Los brotes en caballos jóvenes están asociados a menudo con el destete y la reunión en cuarteles de invierno. Las yeguas de las granjas no tienen en ese mo

20

25

30

1      mento signos patentes de enfermedad, pero se puede demostrar  
la infección por ensayos serológicos. La enfermedad se ex-  
tiende rápidamente dentro de un área de establos o de entre-  
namiento, quedando infectados todos los caballos dentro de  
5      unos pocos días o semanas.

Se han observado abortos en todos los meses excep-  
to julio y agosto. Son más abundantes mediado el invierno  
y al principio de la primavera. De 700 abortos registrados  
en Kentucky, 15% tuvieron lugar en enero, 24% en febrero,  
10     29% en marzo y 18% en abril. El aborto puede tener lugar  
desde el 5º mes de gestación hasta el término completo. Al  
término completo nacen vivos algunos potros infectados pre-  
natalmente. Los datos de 623 abortos muestran que el 11%  
tienen lugar al 8º mes, 30% al 9º mes, 36% al 10º mes y 19%  
15     al 11º mes. Los datos indican una relación entre la edad  
del feto y la aparición del aborto, pero el periodo de crian-  
za de las yeguas y la pauta enzoótica de los caballos jóve-  
nes tienen una influencia importante sobre la incidencia  
estacional y edad del feto en el momento del aborto.

20             El tiempo de incubación entre la inoculación  
nasal y el aborto varía entre 3 semanas y 4 meses, estable-  
ciendo que la infección que tiene como resultado el aborto  
coincide con la infección enzoótica más temprana de los ca-  
ballos jóvenes en la granja. El virus se extiende fácilmen-  
25     te por contacto directo, fomes y secreciones en aerosol. El  
virus se puede extender desde una yegua que aborta a otras,  
pero en la mayoría de los brotes la evidencia indica que ca-  
sí todas las yeguas del lugar estaban infectadas 1 a 4 me-  
ses antes de tener lugar los primeros abortos,

30             La enfermedad tiene lugar anualmente en caballos

1 jóvenes de muchas granjas en las que no se han introducido  
caballos nuevos, lo que sugiere la presencia de portadores  
entre los caballos adultos. La regularidad de brotes cuan-  
do se reúnen caballos jóvenes susceptibles también indica  
5 un estado de portador. Los brotes son frecuentes cuando los  
caballos susceptibles son reunidos para venta, en cercados,  
en áreas de entrenamiento, en reuniones para carreras y en  
establecimientos militares.

El periodo de incubación de la RNE varía de 2 a 10  
10 días. La infección primaria de caballos completamente sus-  
ceptibles se manifiesta por fiebre y una descarga serosa de  
los ollares. Las temperaturas pueden llegar a 41°C, y la  
fiebre persiste durante 1 a 7 días en los casos no compli-  
cados. Las temperaturas son usualmente más altas en la tar-  
15 de que en la mañana. Hay leucopenia en paralelo con la fie-  
bre. Tanto los neutrófilos como los linfocitos están depri-  
midos durante los 2 primeros días de fiebre. Los linfocitos  
vuelven a niveles normales en 2 a 4 días, y los neutrófilos  
alcanzan de nuevo niveles normales en 5 a 9 días. Se puede  
20 reducir el consumo de alimento y agua. Se observa ligera  
congestión de las membranas mucosas nasales, y puede haber  
edema palpable de los nodos linfáticos mandibulares. La  
enteritis y diarrea, edema de las patas, y tendovaginitis  
son infrecuentes en los casos no complicados. La depresión  
25 general es ligera en los caballos que se mantienen en des-  
canso. Todos los signos están exacerbados por el ejercicio  
o trabajo forzados. La recuperación es completa en 1 a 2  
semanas, a no ser que surjan complicaciones.

Puede haber reinfección a intervalos de 4 a 5 me-  
30 ses o más. Estas infecciones subsiguientes son usualmente

1 asintomáticas, sin fiebre, y no dan como resultado compli-  
caciones, especialmente en caballos adultos en granjas de  
cría. El efecto de la reinfección sobre caballos de carre-  
ras o sometidos a trabajo duro no se conoce.

5 La vacuna de la presente invención es una for-  
ma atenuada del virus, preparada a partir de una cepa viru-  
lenta de virus de rinoneumonitis equina (RNE), que se pasó  
en cincuenta (50) pasos por la línea de células Vero (riñón  
de mono) a 26°C.

10 En breve, la invención se refiere a una vacuna  
que se prepara por un procedimiento que comprende las eta-  
pas de inocular un cultivo de células de tejido con una ce-  
pa virulenta de virus de RNE, de manera que tenga lugar la  
reproducción del virus, pasar en serie el virus así propaga-  
do por cultivos de células de tejido adicionales, en un nú-  
mero suficiente de pasos y bajo condiciones tales que los  
virus queden atenuados a un estado no virulento, sin perder  
su carácter inmunógeno.

15  
20 La atenuación, o modificación del carácter vi-  
rulento o patógeno de bacterias o virus a un estado no viru-  
lento o no patógeno, es bien conocida en la técnica.

25 La modificación o atenuación de la morfología  
y/o del carácter patógeno ha sido provocada por muchas téc-  
nicas. A veces, el paso en serie repetido por tejido del  
hospedador atenúa al organismo; el paso en serie por un te-  
jido que sea diferente del tejido del hospedador conduce a  
veces a atenuación; el choque químico al organismo, trata-  
miento de radiación, paso a baja temperatura, y otras técni-  
cas, han sido usados por el bacteriólogo y virólogo para pro-  
ducir organismos patógenamente inertes, que conservan su ca-  
30

1 pacidad de hacer que sus hospedadores formen anticuerpos o  
inmunidad mediatizada por células, capaces de neutralizar  
eficazmente un patógeno. La atenuación sin pérdida de carác-  
ter inmunógeno de un organismo vivo es completamente impre-  
5 decible, y sólo se pueden usar métodos empíricos para deter-  
minar la eficacia de cualquier técnica dada. Por ejemplo,  
una técnica dada que ha resultado aplicable a un tipo de vi-  
rus no siempre puede ser proyectada como aplicable a otro.  
Se han señalado técnicas anteriores para atenuación de una  
10 cepa virulenta de virus de RNE. Por ejemplo, el paso en  
serie de un virus virulento de RNE por tejido de hámster,  
con alguna adaptación, ha sido señalado por E.R. Doll en Vet.  
Bull. 32, 1493. La patente de los EE.UU. nº 3.725.542 descri-  
bió la atenuación de una cepa "virulenta de virus de RNE por  
15 cultivo y multiplicación de virus de rinoneumonitis, despro-  
vistos de una fuente elegida de entre caballos infectados,  
potros infectados, y fetos de caballo abortado, en tejidos  
susceptibles elegidos de entre órganos susceptibles (tales  
como riñón de mono) de animales de ensayo susceptibles, y  
20 líneas permanentes de células susceptibles adecuadas para  
el cultivo y multiplicación de dichos virus, implicando di-  
cha multiplicación de tres a 10 pasos; atenuando completamen-  
te los virus hasta que hayan perdido carácter patógeno para  
el caballo, por paso en serie por cultivos primarios de célu-  
25 las obtenidos de ovejas, cerdos y lechones, y por líneas per-  
manentes de células estables derivadas de estos cultivos pri-  
marios de células.

Se postula que la protección inmunógena frente  
a una exposición subsiguiente a un virus virulento de RNE no  
30 tiene lugar a no ser que el virus no virulento se reproduzca

1 por sí mismo en el animal hospedador, y se pueda recuperar  
e identificar tras haber tenido lugar la vacunación. Hasta  
la fecha, ninguna de las cepas de virus atenuado señaladas  
posee esta característica, y no proporciona el grado de pro-  
5 tección deseado.

Sin embargo, se ha hallado ahora, y forma el  
objeto de la presente invención, que si la línea estable de  
células del mono verde africano, Cercopithecus aethiops, la  
línea de células Vero, es inoculada con un virus virulento  
10 de RNE y se pasa en serie por tal línea de células a tempe-  
raturas reducidas, por ejemplo 23°C a 33°C, el virus queda  
atenuado y no virulento, pero aún conserva su carácter inmu-  
nógeno, es decir, cuando se introduce en un hospedador equi-  
no desencadenará su mecanismo inmunológico para producir an-  
15 ticuerpos virales e inmunidad mediatizada por células. El  
animal queda entonces inmunizado para subsiguientes infeccio-  
nes, y el virus no virulento se puede recuperar del animal  
vacunado e identificar.

Usando técnicas ordinarias de paso en serie  
20 que están normalizadas en la técnica, se ha hallado que se  
ha desarrollado el carácter no virulento deseado, sin pér-  
dida del carácter inmunógeno, tras aproximadamente 30-60  
pasos a una temperatura comprendida entre aproximadamente  
23 y aproximadamente 33°C. Sin embargo, se pueden usar has-  
25 ta aproximadamente 250 o 300 pasos o más.

La vacuna de RNE de la presente invención se  
puede administrar a cualquier especie de la familia de los  
équidos por técnica extra- o interparenterales. La vacuna,  
en forma líquida, se puede administrar por vía intranasal,  
30 intraorgal, intraocular, intramuscular, intravenosa, intra-

1 peritoneal y similares. En forma pulverulenta seca es adecuada para administración extraparenteral. Como es usual con las vacunas de este tipo, se administran de aproximadamente 3.000 a 100.000 unidades TCID<sub>50</sub> en una sola dosis.

5 Las etapas del procedimiento de la invención se pueden describir más claramente como sigue:

#### 1. Reproducción del virus

10 Se prepararon cultivos de células de tejido usando la línea estable de células Vero, derivada del mono verde africano, a un nivel de paso de 129. Un recipiente normalizado de cultivo en vidrio fue sembrado con una suspensión tripsinizada de células Vero que contenía medio suficiente para cubrir las células hasta una profundidad de aproximadamente 12,7 mm. Se usó medio esencial mínimo (MEM) de Eagles, según se define en Handbook of Cell and Organ Culture, de Merchant et al, Burgess Publishing Co., 1964, que contiene 10% de suero fetal de ternero como medio de crecimiento (5% en suero de mantenimiento).

20 Sin embargo, se puede usar cualquier medio normal de crecimiento, tal como medio de hidrolizado de lactalbúmina en solución salina equilibrada de Hanks, medio 199, etc. Los recipientes de cultivo fueron incubados a 37°C durante 1-3 días, tras el cual se formó una monocapa de células Vero.

25 Luego se inoculó el recipiente con herpes I equino, identificado como aislado A183 obtenido de la Universidad de California, usando técnicas asépticas normalizadas, y tras 24-72 horas de incubación a 37°C la citopatología de las células era sustancialmente completa, lo que indica que el virus se había reproducido. El virus se pasó 13

30

1 veces por células Vero a 37°C, como antes, y luego se sometió al método de atenuación detallado a continuación.

#### ATENUACION

5 Usando matraces normalizados para cultivo de tejidos, y el medio de crecimiento MEM antes descrito, se prepararon monocapas de células Vero. Aproximadamente 100 TCID<sub>50</sub>/ml del 13º paso se introdujeron en los matraces, y los matraces inoculados se incubaron a una temperatura de 26°C. Tras aproximadamente 8-10 días se notó una pequeña  
10 área de degeneración de células, y se hizo un segundo paso en serie con algo del medio fluido. La incubación continuó a 26°C, y aumentó la citopatología celular. Tras cada paso en serie aumentó la citopatología, y tras aproximadamente 30-60 pasos en serie se halló que la citopatología era completa tras 3-5 días de incubación a 26°C. Este virus atenuado se identificó como vacuna RNE A183 V26 P50.

15 Los siguientes experimentos en vivo se efectuaron con el paso 50º o 55º del virus adaptado en frío. Todos los virus de vacuna de RNE se administraron por vía I.M. profunda.  
20

Se produjo una exposición a RNE virulenta pasando en serie el virus A183 sin atenuar por lavados nasales y sangre entera, a través de cuatro caballos. El virus pasado por equinos indujo los síntomas clásicos de rinoneumonitis del RNE, así como abortos en animales preñados. La  
25 mezcla de virus de RNE para exposición se usó repetidamente para exponer caballos experimentales, con excelentes resultados en animales no inmunes. Todos los virus de exposición se administraron por vía intranasal.

30 Se usaron ensayos de neutralización de suero

1 para medir todas las respuestas serológicas a la vacuna de RNE o virus de exposición.

La pureza del virus de vacuna de RNE producido como se ha descrito antes se determina neutralizando el efecto citopatógeno (ECP) producido en cultivos de tejido con suero tipo herpes I equino conocido.

El virus de la vacuna produce gran sincitio en células RK<sub>13</sub> y células Vero a 37°C. El sincitio se puede usar como marcador del virus de la vacuna a medida que el virus virulento de exposición a RNE produce un ECP del tipo de redondeo de células individuales, en las anteriores líneas de células, a 37°C.

El virus de la vacuna mata a hámsters recién nacidos, y el virus de la vacuna se recuperó de los hámsters muertos produciendo el mismo tipo de marcador sincitial. No se indujo ningún síntoma clínico de enfermedades virales equinas en caballos o potros vacunados, en grupos de edad variable.

El virus de la vacuna se puede aislar de leucocitos periféricos equinos de 2 a 11 días tras la vacunación contra RNE. No se aíslan otros agentes de virus después de la vacunación, excepto el grupo herpes II de virus indígenas. Además, el virus de la vacuna recuperado de los caballos tiene el marcador de vacuna (sincitio).

El virus de vacuna experimental A183 V26 P50 se comprobó para los siguientes agentes virales adventicios, por técnicas conocidas, y se halló que ninguno estaba presente: virus de anemia infecciosa equina, grupo de virus herpes II equino, adeno virus equino, grupo de virus de encefalomielit<sub>is</sub> equina, y grupo de gripe equina (A/Equi/1; A/Equi/2).

PREPARACION DE LA VACUNA

El virus atenuado preparado como se ha descrito antes se cultivó en grandes cantidades usando el mismo medio de desarrollo antes descrito, en matraces normales de monocapa de células Vero. Los matraces se incubaron hasta que se completó la citopatología, usualmente en 3-4 días. Luego se recogió el medio de desarrollo, y se mezcló con una solución estabilizadora y se dividió en dosis unitarias de aproximadamente 1.000 a 10.000.000 TCID<sub>50</sub>/ml cada una, en los viales usuales para vacuna. Luego se liofilizó el material en los viales, y se cerró hermáticamente para uso.

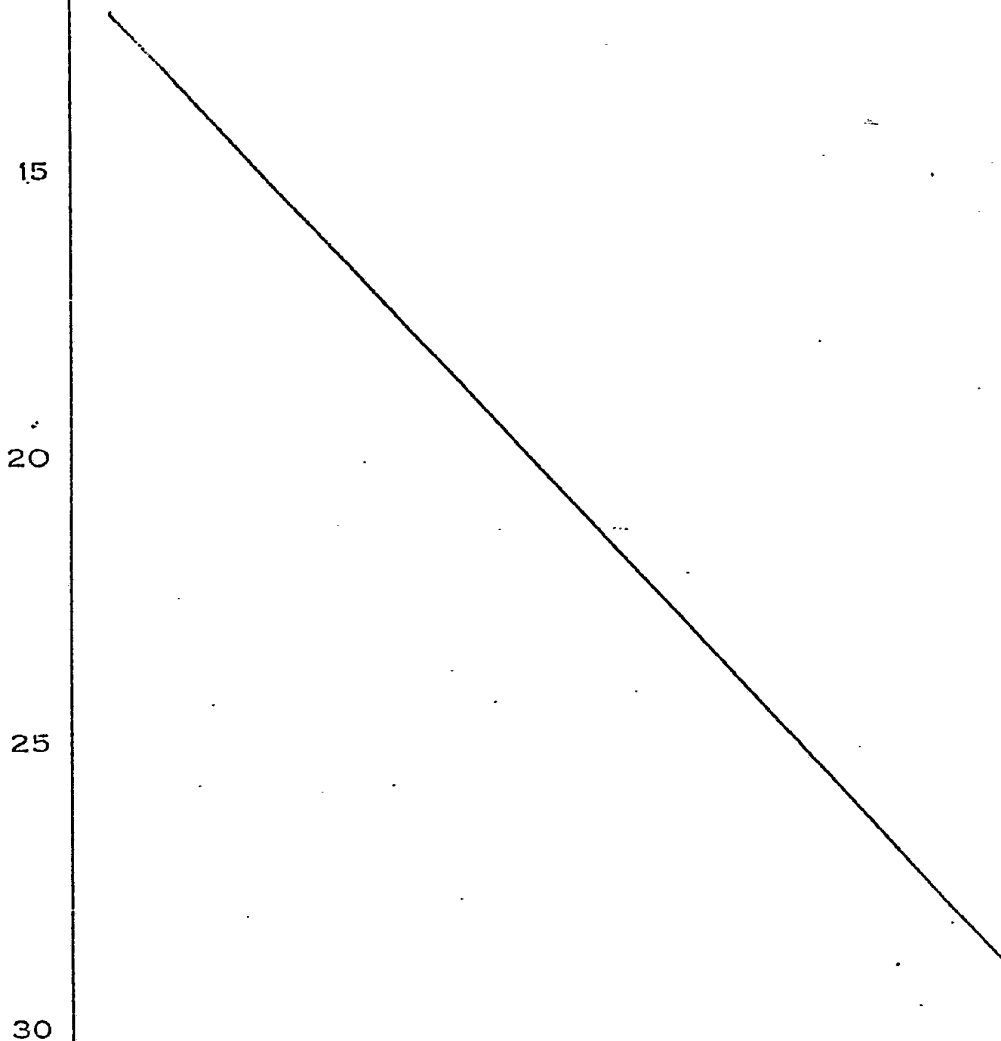
Experimento I

El siguiente experimento estaba destinado a determinar si la vacuna de RNE desarrollada era buena, y a ver si el virus de la vacuna se transmitía a caballos por contacto. Además, se iba a ensayar la eficacia de la vacuna en vivo, frente al virus de exposición.

Un grupo de 6 caballos de razas mezcladas, de ambos sexos, se alojó bajo el mismo techo en una misma cuadra de grupo. La alimentación consistió en avena y heno herbáceo, y había bebederos de autoconsumo. El grupo recibió la vacuna de RNE atenuada. Todas las vacunaciones se administraron por vía I.M. profunda. La primera vacunación fue seguida por una vacunación similar a los 28 días. Todos los caballos fueron expuestos a virus de RNE virulentos 56 días después de la primera vacunación. Se observaron los siguientes parámetros: todos los caballos fueron comprobados a diario para observar signos clínicos de RNE, y las temperaturas y los sueros se observaron durante todo el ensayo. Se eligieron tres caballos para observar el aislamiento de virus.

1 de las células de linfa cuajada y sondas nasales. Los ais-  
lamientos de virus se iniciaron en dos controles de contac-  
to en el momento de la exposición. Se hicieron frecuente-  
mente recuentos completos de sangre en los caballos que se  
5 estaban observando respecto a los aislamientos de virus.

Se hicieron frecuentemente aislamientos e -  
identificaciones bacterianas en caballos que presentaban  
drenaje nasal. Los principales fueron los números 104, 77,  
52, 53 y 54. El control de contacto fue el número 79. Los  
10 resultados se muestran en las siguientes tablas del Experi-  
mento I.



30 25 20 15 10 5 1

EXPERIMENTO I

Neutralizaciones de suero

	+12 días	+21 días	+28 días	+12 días	+20 días	+28 días	+11 días	+21 días	+29 días	+66 días
1ª Vac	128	512	256	128	512	256	512	512	1024	
52	128	512	256	128	512	256	512	512	1024	
53	256	512	1024	128	512	128	256	128	256	
54	64	512	256	256	256	128	512	128	256	
77	0	N.D.	2048	512	256	128	1024	256	256	
104	0	0	64	64	128	128	256	256	128	
79	0	0	0	0	0	0	512	2048	2048	

Vacunados dos veces I.M.

Exposición + 28 días

2ª vac.

+ 20 días

2ª vac.

+ 12 días

2ª vac.

+ 29 días

+ 66 días

P = Principal

C = Control de contacto

N.D. = No determinado

Ninguno de los principales de este experimento tenía signo clínico alguno de RNE

30

25

20

15

10

5

1

EXPERIMENTO I

Aislamiento del virus del herpes equino

	1ª vacunación										2ª vacunación										Exposición			
	0 día	+3	+4	+5	+6	+7	+10	+12	+14	+28	+3	+4	+5	+6	+7	+8	+12	+14	+28	+1	+2	+3	+4	+7

P77	LC			I	I	I																			
	SN						+																		
P104	LC				I	I																			
	SN						II	II																	
C79	*LC																								

(continuación)

		+8	+9	+10	+11	+14	+16	+18	+21
P77	LC				II	II	II	II	II
	SN								
P104	LC								
	SN		II	II	II	II	II	II	II
C79	*LC								
	SN		I	I	II	II	II	II	II

\* Aborto 15 días tras exposición virus herpes I recuperado de feto

I = Virus herpes I equino  
 II = Virus herpes II equino

+ = Virus no identificado  
 P = Principal  
 C = Control de contacto  
 LC = Linfa cuajada  
 SN = Sonda nasal

NO DETERMINADO

1 Un examen de los datos presentados en las tablas del anterior Experimento I, más la ausencia de signos clínicos, indica lo siguiente:

5 1. La vacuna no indujo síntomas de enfermedad tras cualquier vacunación.

2. El virus de la vacuna no se transmitió a los animales de control de contacto en un periodo de 56 días en que se mantuvieron juntos, antes de la exposición. Hubo numerosos aislamientos de virus de herpes II equino en todo este experimento.

10 Aunque el control, C79, mostró los síntomas clínicos normales de la rinoneumonitis equina, es decir, inflamación del conducto respiratorio, anorexia y malestar general, un aumento de temperatura de varios grados por encima de la normal dentro de dos días tras la exposición a virus virulentos, y una severa depresión del recuento de glóbulos blancos de la sangre, los principales vacunados estaban protegidos frente a la exposición a virus virulentos, según se mide por la falta de síntomas clínicos, temperaturas normales del cuerpo, y recuentos normales de glóbulos blancos de la sangre.

#### 20 Experimento 2

25 El siguiente experimento estaba destinado a determinar si la vacuna de RNE atenuada era buena para yeguas preñadas (sin síntomas clínicos ni abortos), y a determinar la eficacia de la vacuna en animales preñados, frente a una exposición a RNE virulenta, a obtener información relativa a anticuerpos pasivos de RNE transferidos a los potros, la ausencia de riesgo de la vacuna a diferentes intervalos de tiempo de preñez, y a determinar si el virus de la vacuna se

30

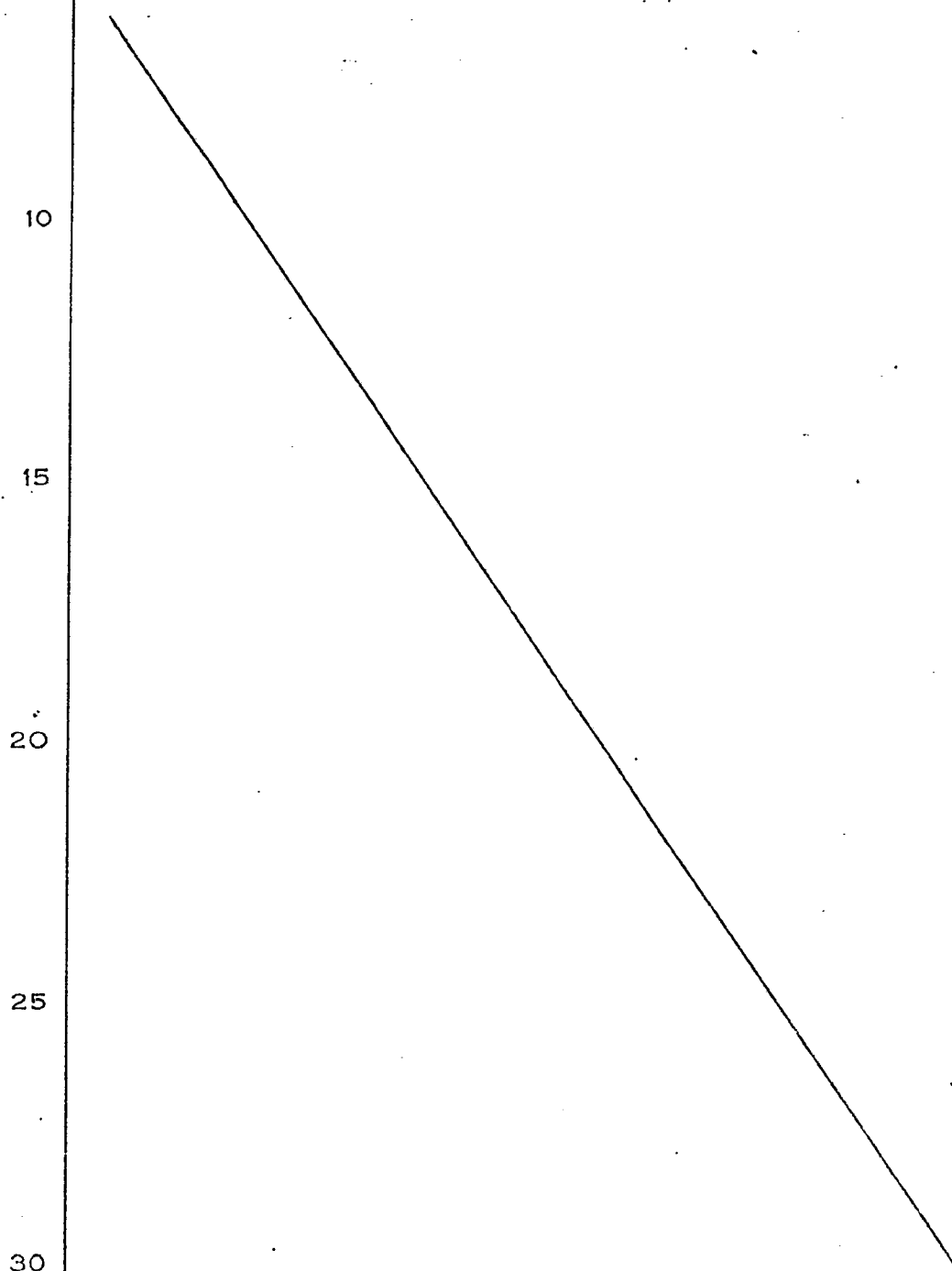
1 transmitiría a controles de contacto que eran animales preñados no vacunados.

El experimento 2 se dividió en cuatro grupos de yeguas preñadas. Dos grupos fueron vacunados una vez y ex-  
5 puestos intranasalmente, 40 días después, a virus de RNE virulento. Uno de los grupos antes mencionados recibió el 50º nivel de paso del virus de vacuna adaptado en frío. Los dos grupos restantes de yeguas preñadas se vacunaron dos veces, con 20 días de diferencia, de manera similar a la de antes,  
10 con los mismos niveles de paso de virus de vacuna adaptado en frío. Los dos últimos grupos fueron expuestos intranasal-  
mente 50 días después de la primera vacuna. Un quinto grupo se usó como caballos y potros de control de exposición.

Se midieron los siguientes parámetros: temperatura,  
15 tura, aislamientos e identificaciones de virus, CBC, títulos de neutralización de suero, y síntomas clínicos. Los parámetros anteriores se midieron tanto en las yeguas como en los potros. Los potros fueron examinados para determinar virus de leucocitos de la sangre y cornetes nasales, inmediatamente  
20 tras ser hallados y dos o tres días tras el nacimiento. Además, se recogieron sueros en el momento de parir a los potros recién nacidos, y semanalmente después. En algunos casos se pusieron barreras de arpillera sobre la glándula mamaria, para evitar que chupasen tras el parto, con el fin de asegurar  
25 algunas muestras de suero anteriores a los calostros. En algunas yeguas se midió el anticuerpo neutralizador de RNE en los calostros. Además, se recogieron muchos pares de muestras de suero, de potros y yeguas, en el momento del nacimiento o más tarde.

30 Muchos de los potros nacidos durante este experi-

1    mento fueron vacunados con el virus de vacuna de RNE atenua  
do a los 10 a 21 días de edad, y estos datos se presentarán  
desde el punto de vista de ausencia de riesgo, en el Experi-  
5    mento 3. Los datos obtenidos de este experimento se presen  
tan en las siguientes tablas del Experimento 2.



EXPERIMENTO 2

Neutralizaciones de suero de RNE y datos pertinentes

Grupo 1 - Yeguas preñadas vacunadas dos veces con virus A183-V26-P50

I.D. na	8-2-74 1ª vac día 0	+14	1-3-74 2ª vac +21	+5	+14	2-4-74 expos. +32	+6	+14	+21	Nacidos vivos	Aborto	Muerte tras nacim.
P65	16	512	1024	512	512	Potro nacido 256	256	512	256	27-3-74	-eliminado	
P70	16	512	512	256	512	Potro nacido 256	256	512	256	4-5-74		
P150	0	128	128	256	256	Potro nacido 256	256	512	512	30-3-74	-eliminado	
P155	4	256	512	512	1024	512	256	64	64	20-5-74		
P157	8	256	256	512	512	512	256	1024	1024	21-4-74		
C140*	>32	16	>16	16	16	16	32	1024	1024	Macho		
C74	Yegua preñ. añadida a expos.	16	>16	16	16	>16	32	512	1024	7-4-74		

Grupo 2 - Yeguas preñadas vacunadas dos veces con virus A183-V-26-P55

P151	4	512	1024	512	256	256	128	512	256	13-4-74		
P152	8	64	128	128	128	128	128	256	128	22-4-74		
P153	2	128	128	128	128	Potro nacido 512	512	6 días antes 512	512	27-3-74	-eliminado	
P154**	2	128	256	256	512	512	512	28-4-74	28-4-74			30-4-74
P156	4	512	256	512	2048	512	>1024	512	512	No preñ.		
C148	8	8	8	8	8	8	16	512	1024	Macho		
C159	Yegua preñ. añadida a expos.>2	8	8	8	8	8	4	256	1024	No disp.	19-4-74	

Continuación Experimento 2

Grupo 3 - Yeguas preñadas vacunadas una vez con virus A183-V26-P50

	20-2-74 día 0	+7	+14	+21	+40	Expos. 1-4-77 +7	+14	+21	+35	Nacidos vivos	Muerte tras nacim.
P160	2	64	512	256	256	256	256	128	128	5-4-74	
P161	16	16	1024	1024	1024	256	512	256	256	23-2-74	23-2-74(1)
P162	2	64	512	512	1024	512	256	256	128	22-4-74	
P164	16	64	1024	1024	512	1024	512	512	1024	24-6-74	
P165	4	16	256	512	256	256	256	256	256	15-5-74	
P163	8	32	>16	32	64	32	512	512	256	16-4-74	
C158					Yegua preñ. añadida a expos. 732	64	1024	1024	1024	9-4-74	10-4-74

30

25

20

15

10

5

Continuación Experimento 2

Días tras vac. en que tuvo lugar el nacim.	Días tras expos. en que tuvo lugar el nacim.	Recuperación de virus de potro o feto	Neutralización en potros títulos Ab 3-14	Días de edad
47	No disp.	-	256	
85	32	-	1024	
50	No disp.	-	128	
101	48	-	512	
72	19	-	512	
No disp.	No disp.	No disp.	No disp.	
58	5	-	4	
94	41	-	128	
73	20	-	16	
47	No disp.	-	128	
79	26	-	No disp.	
No disp.	No disp.	No disp.	No disp.	
"	"	"	"	
"	17	I	"	
44	4	-	128	
3	No disp.	-	No disp.	
61	21	-	64	
123	83	-		
84	44	-	64	
55	15	-	512	
No disp.	8	1	No disp.	

\* Los animales C140 y C148 eran machos de control de contacto

\*\* La yegua 154 no se cuidó de su potro

(1) Murió en el parto

(2) Abortó 1 día antes de la vacunación

P = Principal

C = Control

PE = Potro de exposición

YE = Yegua de exposición

30 25 20 15 10 5 1

EXPERIMENTO 2 (continuación)

Neutralización de suero de RNE y datos pertinentes

I.D. nº	20-2-74 1ª vac día 0	+7	+14	+21	+40 Expos.	4-1-74 Expos.	+7	+14	+21	+35	Nacidos vivos	Aborto	Muerte tras nacim.
Grupo 4 - Yeguas preñadas vacunadas una vez con virus A183-V126-P55													
P166	0	4	256	246	128	128	128	64	16	32	No disp.		
P167	2	64	1024	1024	512	512	512	512	512	512	Preñ.?	19-2-74	
P169	4	64	128	512	128	256	128	128	128	64	5-4-74		
P170	42	128	256	1024	1024	512	256	256	128	128	23-6-74		
P171	4	64	128	64	128	64	64	256	512	512	27-5-74		
C-168	16	8	4	4	16	32	1024	1024	512	512	Preñ.?		

Grupo 5 - Títulos de neutralización de suero de RNE en caballos y potros de control de exposición

I.D. nº	Expos.	+7	+14	+21
C119	128	64	512	
YE174	8	16	4	128
PE174	2	0	16	2
YE175	32	32	512	256
PE175	0	0	2	32

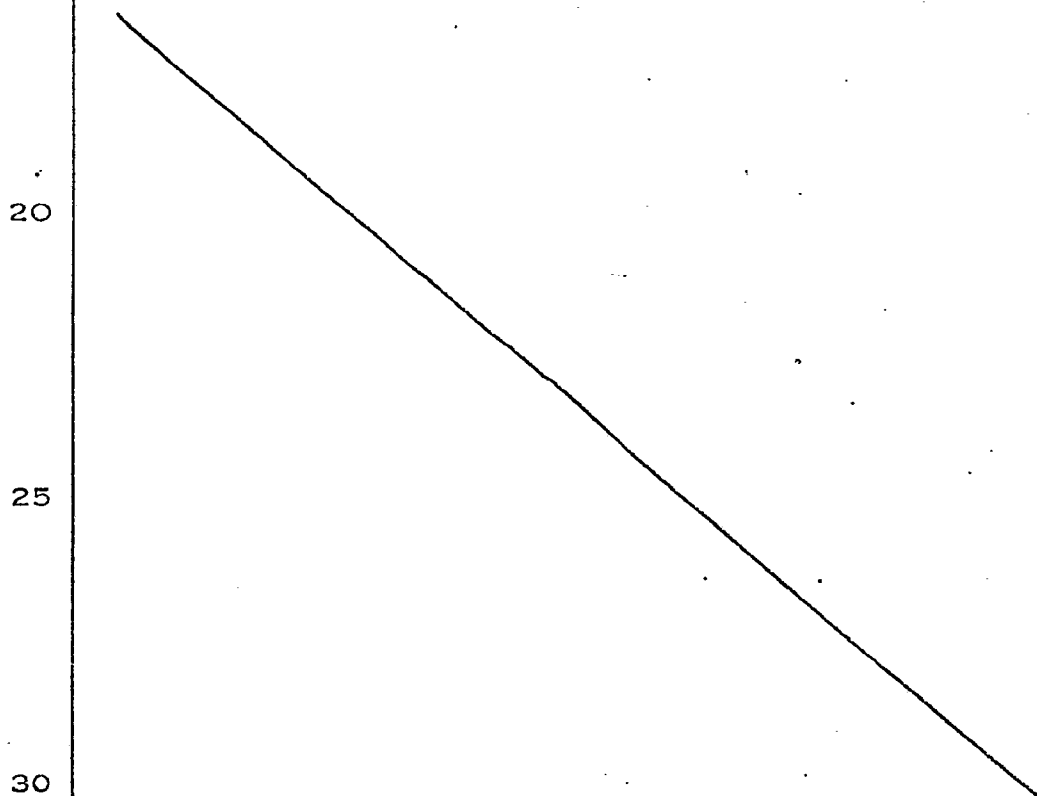
Días tras vac. en que tuvo lugar el nacim.	Días tras expos. en que tuvo lugar el nacim.	Recuperación de virus de potro o feto	Neutralización en potros títulos Ab 3-14
No disp.	No disp.	No disp.	Días de edad
44	4	-	No disp.
122	82	-	8
96	56	-	1024

\* Los aniamles C140 y C148 eran machos controles de contacto  
 \*\* La yegua 154 no se cuidó de su potro  
 (1) Muere durante el parto  
 (2) Abortó 1 día antes de la vacunación ;  
 P = Principal  
 C = Control  
 PE = Potro de exposición  
 YE = Yegua de exposición

1 La Tabla del anterior Experimento 2 muestra la  
ausencia de riesgo y la eficacia de la vacuna de RNE atenua  
da de la presente invención. Se vacunaron y expusieron los  
caballos, y los datos de los Grupos 1 y 2, que se vacunaron  
5 dos veces, y Grupos 3 y 4, que se vacunaron una vez, muestran  
ambos, la ausencia de riesgo y la eficacia de la vacuna de  
RNE atenuada en las yeguas preñadas, durante y después de la  
preñez, y no se aisló ningún virus positivo de vacuna de her  
pes I equino de los potros recién nacidos.

10 TABLAS DE AISLAMIENTO DE VIRUS

El número de aislamientos de virus de RNE des-  
pués de las vacunaciones primera y segunda se compara en  
las siguientes tablas de datos de aislamientos de virus. El  
número de aislamientos de virus de RNE hechos tras vacuna-  
15 ción y exposición se compara entre animales vacunados y de  
control.









20 25 30 35 40 45 50 55

AISLAMIENTOS DE VIRUS DE HERPES EQUINO  
(Continuación)

Grupo 5 - Caballos y potros de control de exposición a RNE

I.D.	Expos. Día 0	+3	+4	+5	+7	+9	+12	+14	+21	+28
C119	LC			I	I	I				
	SN									
YE174	LC			I	I		I		I	
	SN									
PE174	LC	I			+					
	SN	I					I			
YE175	LC			I	I				I	
	SN									
PE175	LC	I		I	I			I		
	SN			I	I			I		

YE = Yegua preñada  
 PE = Potro expuesto  
 LC = Linfa cuajada  
 SN = sonda nasal  
 I = Virus de herpes I equino  
 II = virus de herpes II equino  
 + = Virus sin identificar

1 El examen de los datos presentados en los Grupos 1 a 5 de la anterior Tabla IV indica lo siguiente:

1. La vacuna de RNE era buena cuando se usó en animales preñados en etapas variables de preñez.

5 2. Las yeguas preñadas vacunadas estaban protegidas de aborto y síntomas de RNE después de exposición. Murieron tres de progenie principal. Hubo un aborto un día antes de la vacunación e iniciación del experimento. Un potro murió dos días después del nacimiento, a causa de una madre despreocupada, y un potro murió durante el parto de una madre primeriza. El virus de herpes I equino no se recuperó de esas tres progenies. Las dos muertes que hubo durante el ensayo se atribuyeron al azar, y no estaban relacionadas en modo alguno con la RNE, y no se recuperaron aislados de herpes I equino de los leucocitos de la sangre ni de cornetes nasales de esos potros.

15 3. Los 12 controles de exposición presentaron síntomas típicos de RNE - depresión, respuesta febril, anorexia y leucopenia. Cinco yeguas de control preñadas sospechosas presentaron un aborto y un potro muerto a un día de edad. De ambas de esas dos progenies se recuperó virus de exposición. Dos yeguas presentaron potros normales vivos; una quince días y la otra cinco días después de la exposición. De estos dos potros no se recuperó virus de exposición. Es cuestionable que la restante yegua de exposición estuviese preñada.

20 4. Una sustancial inmunidad pasiva a RNE pasó en los calostros a las progenies, siempre que hubiese un tiempo adecuado entre exposición y parto.

25 30 5. En base a serologías de neutralización de RNE

1 que no aumentaban, y aislamientos negativos de virus, la vacuna no se transfirió a las dos yeguas de control de contacto ni a los dos sementales mantenidos en confinamiento.

### Experimento 3

5 El siguiente experimento estaba destinado a dar información relativa a (a) riesgo de la vacuna en potros, tal como se muestra por signos y exámenes de patología clínica; (b) determinar cuándo se puede vacunar a un potro en la fase de anticuerpos maternos; (c) qué tipo de pauta de aislamiento de virus resulta en un potro vacunado de dos semanas de edad; (d) eficacia del anticuerpo pasivo de RNE.

10 Los siguientes parámetros se midieron en el Experimento 3, Grupos 1 a 4: temperatura del cuerpo, CBC, aislamientos de virus de cornetes nasales y leucocitos de sangre, serologías de neutralización de RNE, y observaciones diarias para determinar signos clínicos de enfermedad.

#### Grupo 1 - Respuesta de potros a vacunación de RNE

15 Este grupo de ocho potros procedía de yeguas con historial bien documentado respecto a su estado de RNE. Los potros se vacunaron por vía I.M. con una sola dosis liofilizada de 1 ml de vacuna de RNE A183 V26 P55, que contenía  $10^{5,8}$  logs de virus/2 ml, que se reconstituyó con 2 ml de agua estéril antes del uso.

#### Grupo 2 - Respuesta de potros a vacunación de RNE

25 (a) El potro número 6 era un potro huérfano. No se disponía de historial de RNE sobre la madre del huérfano.

(b) El potro número 74 procedía de una yegua de control de exposición que parió un potro cinco días después de una exposición intranasal a virus virulento de RNE. El virus de exposición se aisló de la yegua; sin embargo, no se aisló virus

30

1 de RNE del potro tras el parto. Era evidente que no hubo aumento de anticuerpos de RNE en calostros en el corto intervalo antes del nacimiento, tras la exposición.

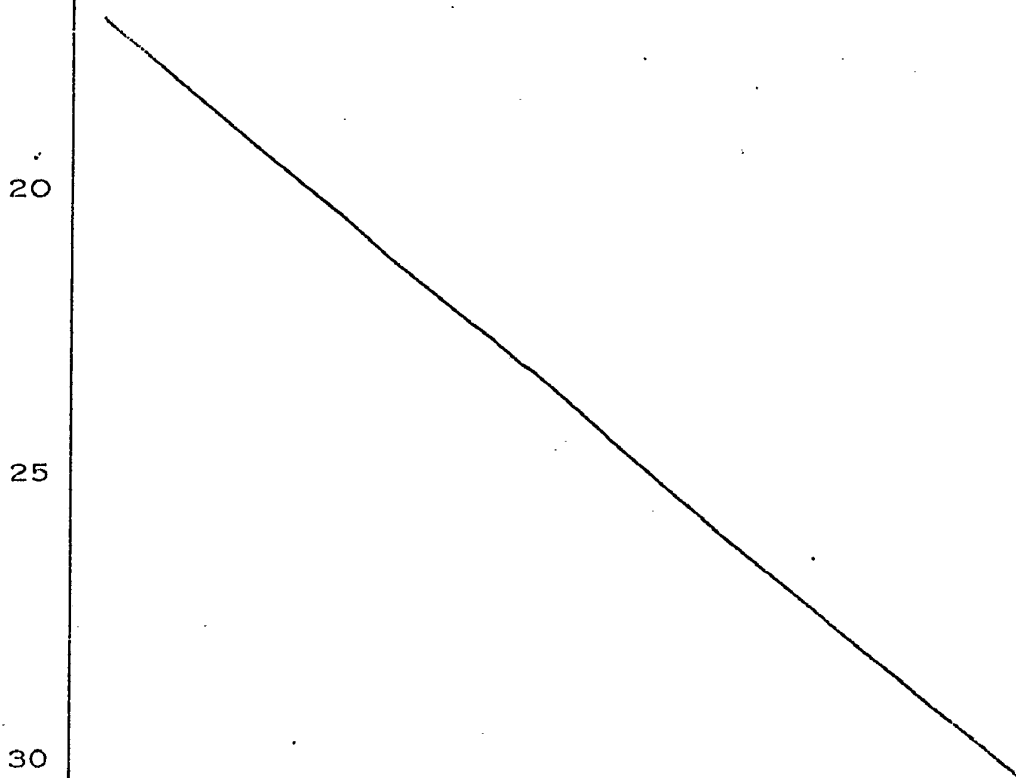
Grupo 3 - Potros expuestos a virus virulento de RNE

5 Este grupo de potros consistía en cuatro, que fueron expuestos intranasalmente, por catéter, con 10 ml de virus virulento de RNE que contenía  $10^{2,7}$  logs de virus/2 ml. El historial de RNE de las yeguas implicadas estaba bien documentado.

10 Grupo 4:

Este grupo consistía en dos potros procedentes de madres con historiales de RNE desconocidos. Los potros fueron expuestos de manera similar a la de los potros del grupo 3.

15 Los resultados de este experimento se presentan en las siguientes tablas.



EXPERIMENTO 3

Hoja de datos de potro y yegua

Grupo 1: Potros vacunados (de yeguas vacunadas y/o con exposición antes de parir) recibiendo una dosis I.M. de virus A183 V26 P55

Yegua y potro nº	Designación del grupo	Estado de la yegua en el parto		Título de anticuerpos de neutralización de RNE en potros		Edad y título Ab de neutralización en el momento de vacunación y/o exposición
		Días tras 1ª vac.	Días tras exposición	0 a 16 hrs	16 a 10 días	
48	1x vac., sin exp.	59	No disp.	512	0	11 días
65	2x vac., sin exp.	47	No disp.	512	1024	23 días - 512
151	2x vac., con exp.	94	41	256	0	9 días - 128
152	2x vac., con exp.	73	20	128	4	10 días - 16
162	1x vac., con exp.	61	21	256	32	10 días - 64
163	1x vac., con exp.	55	15	512	4	22 días - 64
165	1x vac., con exp.	84	44	128	32	7 días - 64
171	1x vac., con exp.	96	56	256	512	9 días - 1024

Grupo 2: Potros vacunados

Subgrupo A (sin historial de la yegua)

6	sin vac., sin exp.	No disp.	No disp.	Inform. no disponible	Inform. no disponible. 128	22 días - 64
---	--------------------	----------	----------	-----------------------	----------------------------	--------------

Subgrupo B (tiempo inadecuado para transferencia de Ab pasivo de yegua a potro)

74	sin vac., sin exp.	No disp.	5	16	0	31 días - 4
----	--------------------	----------	---	----	---	-------------

30 25 N. O. 5 0 5

EXPERIMENTO 3 (continuación)

grupo 3: Potros con exposición (de yeguas vacunadas y/o con exposición antes del parto) recibiendo I.N. virus A-183 del tipo natural

Egua y otro nº	Designación del grupo	Estado de la yegua en el parto		Título de neut. de RNE	Título de anticuerpos de neutralización de RNE en potros		Edad y título Ab de neutralización en el momento de vacunación y/o exposición
		Días tras la vac	Días tras exposición		Horas o días tras el parto	3 a 10 días	
68	con exp., 1x vac.	78	483	512	512	1024	13 días - 256
70	2x vac.; con exp.	85	32	0	1024	1024	11 días - 512
155	2x vac.; con exp.	101	48	512	0	32	15 días - 64
157	2x vac.; con exp.	72	19	128	32	512	11 días - 512

grupo 4: Potros de control de exposición (de yeguas sin vacunar y sin exponer) recibiendo I.N. virus A183 del tipo natural

174	No disp.	No disp.	No disp.	Inform. no disponible	Inform. no disponible	Inform. no disponible	14 días - 0
175	No disp.	No disp.	No disp.	"	"	"	20 días - 0

## EXPERIMENTO 3 - PARTE B

## AISLAMIENTO DE VIRUS, IDENTIFICACION Y/O EXPOSICION EN POTROS

## Grupo 1: Vacunados

		+3	+5	+7	+9	+10	+12	+13	+14	+21	+27
5	LC			I	+						
	48 SN										
	LC			I							
	65 SN										
	LC			I	+						
	151 SN										
	LC	I	I	I							
	152 SN		I	I	I						
	LC		I	I							
	162 SN										
10	LC				I	I	I				
	163 SN										
	LC		I	I	I						
	165 SN										
	LC			I	I						
	171 SN										

## Grupo 2: Vacunados

15	LC		+	+							
	6 SN										
	LC	I	I	I	II	II	II		II		
	74 SN								II	II	I

## Grupo 3: Potros con Ab pasivo de RNE - Expuestos:

	LC			I			I		I		
	68 SN										
	LC			I	I				I		
	70 SN										
20	LC			I	I	I		I		I	
	155 SN			I	I	I		I			
	LC			I							
	157 SN								I		

## Grupo 4: Potros de control de exposición

	LC	I		+							
	174 SN	I	I		+		I		I		
	LC	I	I	I	I				I		
25	175 SN		I	I	I		I		I		

I = Virus de herpes I equino  
 II = Virus de herpes II equino  
 + = Virus sin identificar

1 Ninguno de los potros vacunados mostró ningún  
signo clínico adverso. Ocasionalmente se aisló la bacteria  
Streptococcus zooepidemicus de pasos nasales durante drena-  
5 con la vacuna de RNE.

Ninguno de los cuatro potros expuestos (Grupo  
3) que contenían anticuerpos de RNE de calostros enfermó ni  
quedó deprimido, como los potros expuestos que no tenían an-  
ticuerpos de RNE de calostros.

10 Era evidente que la temperatura normal del  
cuerpo de los potros era mayor que en sus equivalentes adul-  
tos. Además, la tensión ambiental, tal como la manipulación  
de los potros y el estar bajo el sol caliente, pareció te-  
ner más influencia sobre las fluctuaciones de temperatura.  
15 Parece haber en general una tendencia a la leucopenia en los  
potros vacunados, entre los 3 y 7 días. La leucopenia es  
más severa en los potros de control expuestos que en los po-  
tros vacunados.

20 Una marcada respuesta febril entre 2 a 6 días  
tras la infección se notó en los potros expuestos que no te-  
nían anticuerpos pasivos de RNE. No parece haber una eleva-  
ción consistente de la temperatura tras vacunación de RNE  
en potros expuestos a RNE con altos niveles de anticuerpos  
pasivos de RNE. Un potro (155) que presentaba los más bajos  
25 anticuerpos de RNE de neutralización (1:64) mostró una eleva-  
ción de temperatura similar a la de potros de control de ex-  
posición; sin embargo, no se observó depresión ni anorexia.

Los siguientes puntos sobresalientes se pueden  
extractar de los datos experimentales obtenidos.

30 1. El virus de células Vero, adaptado en frío (26°C), se re-

- 1 pite en vivo cuando se administra por vía I.M., produciendo una inmunidad protectora (humoral y mediatizada) por células frente a virus virulento de exposición a RNE, cuando se administra intranasalmente.
- 5 2. El virus de vacuna no es patógeno cuando se administra a yeguas preñadas y a potros procedentes de diversos antecedentes inmunológicos de RNE.
- 10 3. El virus de vacuna se puede aislar de caballos que han tenido exposición previa a RNE (según se mide por los anticuerpos de neutralización de RNE), o de animales sin anticuerpos de neutralización. Frecuentemente se puede recuperar el virus de leucocitos de la sangre lavados, o infrecuentemente de cornetes nasales.
- 15 4. El virus de vacuna de RNE no se transmite a caballos de control de contacto, en base a la no conversión sero de animales de control de contacto, y por datos negativos de aislamiento de virus con animales de control.
- 20 5. Las serologías de neutralización de animales vacunados se comparan favorablemente con las inducidas por virus virulentos de exposición a RNE.
- 25 6. Los anticuerpos de RNE de calostros, de alto título, transferidos pasivamente a potros, protegen aparentemente (no hay síntomas visibles) a los potros frente al virus virulento de exposición a RNE.
- 30 7. La inmunidad mediatizada por células parece desempeñar un papel importante en la protección de caballos contra los abortos por RNE y los signos clínicos de RNE; sin embargo, no se ha hallado aún una manera viable de medir la inmunidad celular a RNE, aparte de los experimentos de exposición directa.

El número de aislados de virus recuperados tras

1 vacunaciones con una vacuna de RNE de repetición, o exposi-  
ción a virus virulentos de RNE, depende mucho del tipo y  
grado de inmunidad que presente el hospedador. Prevalecen  
mucho los aislamientos de virus de potros con altos niveles  
5 de anticuerpos de neutralización de RNE, de calostros. Se  
consideran que esos potros tienen inmunidad humoral, y que,  
dependiendo del grado, sí mejora la sintomatología cuando  
se exponen a virus virulentos. Sin embargo, la inmunidad  
humoral desempeña poco o ningún papel para cortar un estado  
10 de portador de virus. En contraste, la inmunidad activa in-  
ducida con la infección de virus, ya sea un virus de vacuna  
de repetición o un virus virulento, induce inmunidad tanto  
mediatizada por células como humoral. Por los datos es evi-  
dente que tras nueva exposición a virus de vacuna de repeti-  
15 ción, o virus virulento, se elimina prácticamente el estado  
de portador de virus; sin embargo, esto no es absoluto. Esto  
parece existir en animales no sensibilizados a RNE, y en ani-  
males anteriormente sensibilizados a RNE, en base a las se-  
rologías. Es evidente que la inmunidad celular, como la  
20 inmunidad humoral, decae con el tiempo. El intervalo de  
tiempo implicado en el agotamiento de la inmunidad celular  
es desconocido en este momento.

8. El virus de vacuna de RNE no cruza la barrera placenta-  
ria, en base a muestras negativas de suero de neutralización  
25 anteriores a los calostros, en ocho potros recién nacidos.  
Además, no se aisló virus positivo de vacuna de herpes I  
equino de 18 potros recién nacidos, de yeguas vacunadas-ex-  
puestas. También resulta que las curvas de agotamiento de  
anticuerpos de neutralización de RNE, adquiridos pasivamen-  
30 te, en cinco potros aislados, decaen sin interrupción, lo que

1 indica que no hay exposición en el útero a virus de herpes I,  
ya que no parece haber inducción activa de anticuerpos de -  
herpes I.

5 9. Los aislamientos de virus de vacuna de RNE se recuperaron  
más frecuentemente de leucocitos de la sangre que de los cor-  
netes nasales. Este hallazgo también es aplicable al virus  
de vacuna administrado intranasalmente. Aunque sólo produ-  
jeron aislados dos principales, de cuatro, todos eran de leu-  
10 cocitos de la sangre. Muchos de los aislamientos de virus  
(de vacuna) nasal recuperados en los experimentos se pueden  
haber originado por diminutas cantidades de sangre absorbi-  
das de capilares dañados en el proceso de tomar muestras,  
con sondas nasales de 15 cm de longitud, de animales en movi-  
miento. Desde luego, algunas "muestras de sonda nasal se per-  
15 dieron a causa de contaminación por bacterias y mohos.

20 10. Hubo tres casos claros de catarro clínico y muchos ais-  
lamientos de Streptococcus zooepidemicus, Strep. equisilimicis,  
strep-grupo E, Staph. Aureus, se halló que un potro tenía  
Streptococcus equi. Estas bacterias se aislaron periódicamen-  
te de animales en ensayo. Todas estas bacterias tienen la  
capacidad de producir signos clínicos de fiebre y/o drenaje  
nasal; por tanto, se vigilaron frecuentemente para ayudar a  
determinar la causa de cualquier anomalía clínica que pudie-  
ra tender a confundir los resultados obtenidos de animales  
25 en ensayo. En la mayoría de los casos las expansiones bac-  
terianas fueron muy evidentes cuando se revisaron los diagra-  
mas de temperatura del caballo y leucocitos totales.

30 El Streptococcus zooepidemicus es frecuente-  
mente un agente acompañante del virus de la rinoneumonitis  
equina, lo que no es sorprendente en vista de su naturaleza

1 de ubicuidad en la población equina. Parecería que cualquier  
tensión severa del caballo puede incitar a la expansión de  
Strep. zooepidemicus.

5 Para resumir brevemente, la presente invención  
se refiere a una vacuna y al método para prepararla. Un ais-  
lado A183 virulento de un virus de herpes I equino se intro-  
duce en una monocapa de una línea permanente de células Vero,  
que se incuba 3 a 5 días a 37°C, y se completó la citopatolo-  
10 gía de las células. Una monocapa de células estables, recién  
preparada, de células Vero, se inoculó con una por-  
ción del virus recogido producido. Se volvió a incubar el  
cultivo para producir la citopatología de al menos una por-  
ción de las células de tejidos. Después, una porción del vi-  
rus producido se pasó en serie al menos 30 veces, a una tem-  
15 peratura de incubación de 26°C, y se recuperó el virus no  
virulento, de línea, inmunológicamente activo.

20 Como será fácilmente evidente para los exper-  
tos en la técnica, por lectura de la anterior descripción de  
tallada y ejemplos, se pueden hacer en ella diversas modifi-  
caciones sin salir del espíritu de la presente invención, y  
tal alcance de dicha invención solo estará limitado por el  
ámbito de las reivindicaciones adjuntas.

25

30

REIVINDICACIONES

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:

1<sup>a</sup>.- Procedimiento para la obtención de un virus vivo de herpes de rinoneumonitis equina, atenuado e inmunológicamente activo, que comprende las etapas de: a) introducir un virus vivo virulento de rinoneumonitis equina en un cultivo de células de tejido; b) incubar el cultivo hasta que se haga evidente la citopatología celular; c) recoger una porción del virus así producido y volver a introducir el virus recogido en cultivos de tejido frescos; d) repetir el paso en serie del virus por cultivos de tejidos, un número suficiente de veces, a una temperatura de incubación suficiente para producir un virus no virulento vivo, inmunológicamente activo; y e) recuperar dicho virus de dicho medio de cultivo de tejidos.

2<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, donde dicho cultivo de células de tejidos es un cultivo de células Vero.

3<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>, donde la temperatura de incubación de los pasos en serie se mantiene en una comprendida entre aproximadamente 23°C y aproximadamente 33°C.

4<sup>a</sup>.- Procedimiento según la reivindicación 1<sup>a</sup>,

1 donde la temperatura de incubación de cada paso en serie es  
aproximadamente 26°C.

5 5ª.- Procedimiento según la reivindicación  
1ª, donde el paso en serie se efectúa al menos treinta ve-  
ces.

6ª.- Procedimiento según la reivindicación  
1ª, donde al menos se efectúa 50 pasos en serie en la in-  
cubación de 23°C a aproximadamente 33°C.

10 7ª.- Un procedimiento para la obtención de  
un virus vivo de herpes de rinoneumonitis equina.

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

Esta Memoria consta de treinta y nueve hojas  
escritas a máquina por una sola cara.

Madrid, 05.DIC.1977

P.A.

Fernando de Elizabere  
Por Poderes