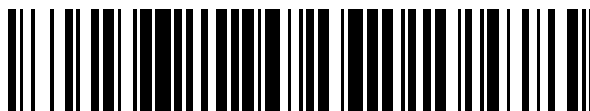


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 383 429**

51 Int. Cl.:  
**C12N 1/10** (2006.01)  
**A61K 39/012** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **99912985 .1**
- 96 Fecha de presentación: **30.03.1999**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **1068293**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **17.01.2001**

54 Título: **Modalidades de vacunación**

30 Prioridad:  
**30.03.1998 AU PP268398**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**21.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**21.06.2012**

73 Titular/es:  
**Eimeria Pty. Limited  
55 Wonga Road  
North Ringwood, VIC 3134, AU;  
The State of Queensland Through the  
Department of Primary Industries y  
RURAL INDUSTRIES RESEARCH AND  
DEVELOPMENT CORPORATION**

72 Inventor/es:  
**RICHARDS, David, Grant;  
JORGENSEN, Wayne, Keith y  
STEWART, Norman, Porter**

74 Agente/Representante:  
**Rizzo, Sergio**

ES 2 383 429 T3

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).

## Modalidades de vacunación

### Descripción

5 [0001] La presente invención hace referencia a las cepas de vacunación de *Eimeria* y las vacunas que incluyen las mismas.

[0002] La coccidiosis es una enfermedad de gran importancia económica para la industria avícola intensiva existente en todo el mundo. El agente causal es la *Eimeria*, un parásito protozoario.

10 [0003] Se han identificado siete especies diferentes de *Eimeria* en pollos, concretamente *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. necatrix*, *E. tenella*, *E. mitis*, *E. praecox* y *E. brunetti*. Puede darse que no todas estas especies estén presentes en cualquier país o región. La *E. máxima*, *E. acervulina*, *E. necatrix* y *E. tenella* son especies frecuentes de *Eimeria*.

15 [0004] La *Eimeria* tiene un ciclo de vida complicado. Sus detalles se describen bien, por ejemplo, en *Poultry Coccidiosis: Diagnostic and testing procedures*, segunda edición, Pfizer Inc. En resumen, cuando se ingiere un oocisto de coccidia esporulado (infeccioso), se liberan esporozoitos para iniciar ciclos sexuales y asexuales que conducen al desarrollo de miles de nuevos oocistos, que son expulsados en las heces. Poco después, estos oocistos esporulan y resultan infecciosos para otras aves. Un solo oocisto esporulado puede dar como descendencia incluso diez mil más. La *Eimeria* produce lesiones en el intestino al destruir las células epiteliales en las que se desarrolla y multiplica, y por traumatismo de la mucosa y submucosa intestinal.

25 [0005] Las diversas especies de *Eimeria* (que también se pueden denominar coccidia) pueden identificarse mediante las características microscópicas de los oocistos (tamaño, forma, largo y ancho), la localización preferida de la coccidia en el intestino, la naturaleza de las lesiones producidas, la prevalencia de periodo, el número de veces que se produce la esporulación y el índice reproductivo, pruebas de ADN y la falta de protección cruzada entre especies. Por lo tanto, se puede identificar la infección de una especie particular con precisión general basándose en una o más de estas características.

30 [0006] Los signos clínicos de la coccidiosis incluyen la diarrea, que puede ser mucoide o con sangre y la deshidratación. Estos síntomas se dan normalmente seguidos de plumaje encrespado, anemia, apatía, pérdida de peso, retracción de la cabeza y el cuello y somnolencia. La coccidiosis en gallinas ponedoras se observa normalmente por la caída en la producción de huevos. Las aves en crecimiento infectadas, pronto dejan de crecer de manera satisfactoria. Con cepas altamente virulentas, la mortalidad en los pollos es generalmente muy alta.

**[0007]** Según cifras de 1997, se crían aproximadamente veinte mil millones de aves al año en todo el mundo. El control de la coccidiosis en una población de aves tan numerosa se ha realizado normalmente mediante fármacos anticoccidiales que han sido eficaces en general. Sin embargo, no sorprende que ahora la resistencia a los fármacos sea un problema puesto que un número creciente de cepas de *Eimeria* son resistentes a los fármacos quimioterapéuticos. El desarrollo de cepas de *Eimeria* altamente virulentas y resistentes a los fármacos podría devastar la industria avícola.

**[0008]** El posible control de la coccidiosis mediante vacunación ha adquirido interés con el transcurso de los años, sin que haya habido ningún gran logro. Los intentos de desarrollar vacunas creadas genéticamente o vacunas de subunidades no ha tenido éxito hasta el momento (Shirley, 1992, Br. Vet. J., 148:479). En Gran Bretaña se ha utilizado una vacuna viva (Paracox, Pitman-Moore) que contiene oocistos de cepas atenuadas de coccidia.

**[0009]** La vacuna viva de Paracox a la que se hace referencia arriba se basa en líneas precoces de diversas especies de *Eimeria*. Las líneas precoces de *Eimeria* son poblaciones que completan su ciclo endógeno en el huésped más rápidamente que las cepas de tipo salvaje. El proceso de esta selección fue descrito por primera vez por Jeffers (1975, J. Parasitol. 61, 1083- 1090). El pasaje seriado en los pollos del primer oocisto producido durante la infección produce parásitos caracterizados por un ciclo de vida abreviado, y posiblemente cierta atenuación de la virulencia. Los problemas asociados con las líneas precoces son el fracaso en la protección contra especies virulentas de *Eimeria*, una capacidad reproductiva pobre, de manera que no es viable producir una vacuna utilizando tales cepas, y cuestiones de estabilidad asociadas con la atenuación, y mantenimiento de la infectividad. Por ejemplo, Shirley y Bellatti (1988, Re. Vet. Sci., 44:25-28) describen una línea precoz de *E. máxima* que no protegía adecuadamente de la exposición a cepas heterólogas virulentas.

**[0010]** Martin A.G. et al. (Int. J. Parasitol., vol. 27, nº5, 1997, páginas 527-533) describe la protección cruzada entre cinco cepas de *Eimeria maxima*, dos cepas de laboratorio y tres cepas de campo de Maryland (MD), Carolina del Norte (NC) y Florida (FL). Mientras que dos cepas de laboratorio y la cepa de NC presentaban protección cruzada entre ellas, las cepas de MD y FL no lo hacían, incluyendo protección únicamente contra la cepa homóloga. Danforth H. D. et al. (Avian Diseases, vol. 41, nº 4, Oct. 1997, páginas 792-801) describe la inmunización de pollos con un solo aislado de campo de *Eimeria maxima* resistente a fármacos aislado en Maryland.

**[0011]** La EP 0 047 662 A2 revela *E. necatrix* atenuada en huevo adecuada para su uso en la producción de una vacuna viva para la prevención y el control de la coccidiosis en las aves de corral. La EP 0 256 878 A2 revela vacunas activas contra la

coccidiosis en aves domésticas. Estas vacunas contienen cepas precoces atenuadas de especies de *Eimeria*. La WO 94/16725 A1 muestra que se puede lograr la inmunidad contra la coccidiosis mediante la administración de oocistos esporulados vivos a pollos de un día de edad, sin necesidad de proporcionar una terapia anticoccidial suplementaria.

**[0012]** Los presentes inventores han producido, de forma sorprendente, cepas de vacuna de *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. tenella* y *E. necatrix*, que son fuertemente protectoras frente a cepas virulentas de sus respectivas especies, crecen a un ritmo que permite la producción de vacunas, y son estables.

**[0013]** El aislamiento geográfico de Australia de enfermedades coccidiales extranjeras asegura que las vacunas y las cepas de vacunas aquí descritas son únicas y, por lo tanto, se distinguen claramente de las cepas precoces de *Eimeria* descritas previamente.

**[0014]** Según un primer aspecto de la presente invención, se proporciona una vacuna que incluye de tres a cinco cepas de *E. maxima* ARI-73/97, *E. acervulina* ARI-77/97, *E. tenella* ARI-11/98, *E. necatrix* MCK01 y/o *E. necatrix* ARI-MEDNEC<sub>3+8</sub>, o antígenos de dichas cepas, en combinación con un portador o excipiente aceptable en uso veterinario, en la que dichos antígenos son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en un ave vacunada.

**[0015]** La vacuna puede contener otras especies de *Eimeria* además de las cepas arriba mencionadas. Por ejemplo, tales especies adicionales pueden ser cepas de *Eimeria* de *E. brunetti*, *E. mitis*, y/o *E. praecox* y/o una o más cepas de vacuna de *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. necatrix* y/o *E. tenella*. Tales cepas adicionales, pueden no ser tan útiles como las cepas de la presente invención, sin embargo, pueden seguir resultando componentes ventajosos de una composición de vacuna de amplio espectro. La vacuna también puede incluir al menos una cepa adicional no atenuada. Por ejemplo, un modo de realización de la vacuna puede contener *E. maxima* ARI-73/97, *E. acervulina* ARI-77/97, *E. tenella* ARI-11/98 y/o *E. necatrix* MCK01 y/o *E. necatrix* ARI-MEDNEC<sub>3+8</sub>, y opcionalmente una o más cepas seleccionadas de entre *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. mivati* y/o *E. praecox* para obtener una vacuna polivalente.

**[0016]** Se pueden preparar cepas adicionales de esta invención teniendo competencia como vacuna inmunizando aves con una o más de las cepas de *E. maxima* ARI-73/97, *E. acervulina* ARI-77/97, *E. tenella* ARI-11/98 y/o *E. necatrix* MCK01, y exponiendo las aves inmunizadas a las cepas candidatas de aislados de campo. Aquellas cepas que producen un gran número de oocistos en las aves inmunizadas, debido a que la vacuna no presenta protección cruzada para ellas (un caso improbable), son entonces sometidas a pasaje seriado por las aves para obtener una cepa de la invención que

sea fuertemente protectora frente a cepas virulentas, teniendo una tasa de reproductividad que permite la producción de la vacuna, es estable, y sensible a los fármacos coccidiostáticos.

**[0017]** Los organismos en las vacunas de la presente invención se encuentran en forma de oocistos o esporocistos enteros y/o fragmentados o esporulados, o antígenos de los mismos capaces de inducir una respuesta inmune protectora en un ave vacunada. Por comodidad, se utilizará el término oocisto para referirse a un oocisto esporulado, o a una mezcla de oocistos y oocistos esporulados. Se causa la esporulación de los oocistos según los métodos conocidos en la técnica, como describe Jensen et al (1976) The Journal of Parasitology 2, 195-198 y 199-202. Los esporocistos o los oocistos esporulados son infecciosos para las aves por vía oral, gota ocular, nasal o parenteral. Los antígenos son generalmente proteínas o péptidos o fragmentos de los mismos (comprendiendo por ejemplo 5 o más aminoácidos, como de 5 a 50 aminoácidos). Los carbohidratos, lípidos, glicolípidos y similares también pueden comprender antígenos. Los antígenos se derivan generalmente de la fase de esporozoito de los organismos. Los antígenos pueden producirse por medios estándares incluyendo la tecnología del ADN recombinante, la purificación de proteínas y otros métodos conocidos en la técnica.

**[0018]** Los portadores aceptables para uso veterinario incluyen agua, solución salina, solución salina amortiguada como la solución salina amortiguada con fosfato, o cualquier otro diluyente fisiológicamente adecuado. Los portadores pueden incluir uno o más agentes de suspensión, agentes espesantes o conservantes, incluyendo geles, gelatinas, hidrosoles, celulosa o gomas polisacáridas fisiológicamente adecuados. Los excipientes pueden incluir vitaminas, antibióticos y antimicóticos (virucidas, bactericidas y/o fungicidas), tensoactivos y similares. Los ejemplos incluyen uno o más de estreptomina, linomicina, anfotericina, formaldehído, bilis de pollo, hipoclorito de sodio, taurocolato de sodio, suero fetal bovino y clorhidrato de cistina.

**[0019]** Las vacunas pueden comprender una o más cepas de *Eimeria*, y pueden contener de aproximadamente 50 a aproximadamente 50.000 oocistos esporulados por ml o más. El número de cada especie de *Eimeria* presente en la vacuna será el mismo generalmente para las cepas según la presente invención. Sin embargo, en los casos en que se usen cepas de vacuna adicionales, por ejemplo como las de *E. brunetti*, las cuales son cepas adicionales y no cepas según la presente invención, se puede usar un número de organismos proporcionalmente mayor debido a la respuesta menos protectora en comparación con las cepas de la presente invención. A modo de vacunas de ejemplo, como pueden ser las de administración ocular u oral, una dosis de vacuna puede contener entre 15 y 500 oocistos esporulados.

[0020] Las vacunas según la presente invención pueden contener otros componentes de vacuna efectivos contra otra enfermedad de las aves de corral. Los ejemplos incluyen la vacuna de Marek, las vacunas de la viruela aviar, el micoplasma y la salmonela. Por lo tanto, en otro aspecto de la invención se proporciona una vacuna como la descrita arriba que incluye componentes de vacuna contra uno o más de las enfermedades de la enfermedad de Marek, infecciones por micoplasma o salmonela.

[0021] Las vacunas según la presente invención pueden administrarse *in ovo* (por ejemplo a partir del día 18-20 de incubación), a pollitos o aves adultas. La vía de administración puede ser oral, intraocular a través del conducto lagrimal, o por otros medios conocidos para la administración de vacunas. A modo de ejemplo, puede pulverizarse una vacuna en un medio adecuado sobre un grupo de aves, sobre el alimento, puede administrarse en el ojo mediante gotas, en el agua de alimentación, como parte del alimento preparado, o incorporado en un paquete de gel (como incluir oocistos esporulados en una matriz de gelatina).

[0022] En otro aspecto, la presente invención hace referencia a las cepas de vacuna de *Eimeria* seleccionadas de entre el grupo de *E. maxima* ARI-73/97, *E. acervulina* ARI-77/97, *E. tenella* ARI-11/98, *E. necatrix* MCK01 y/o *E. necatrix* ARI-MEDNEC<sub>3+8</sub>, o antígenos de una o más de dichas cepas, en el que dichos antígenos son capaces de inducir una respuesta inmune protectora en un ave vacunada. Preferentemente, las cepas se proporcionan en forma de oocistos y/o oocistos esporulados.

[0023] Se realizaron depósitos de las cepas de *Eimeria* según esta invención en los Laboratorios Analíticos del Gobierno Australiano (*Australian Government Analytical Laboratories, AGAL*), uno de los depositarios del Convenio de Budapest, de 1 Suakin Street, Pymble, Nueva Gales del Sur, 2073, Australia el 17 de marzo de 1998, a excepción de la de *E. necatrix* ARI-MEDNEC<sub>3+8</sub> que fue depositada el 30 de marzo de 1999. A continuación se indican los detalles:

Cepa	Número de orden
<i>E. maxima</i> ARI-73/97	NM 98/02796
<i>E. acervulina</i> ARI-77/97	NM 98/02794
<i>E. necatrix</i> MCK01	NM 98/02797
<i>E. necatrix</i> ARI-MEDNEC <sub>3+8</sub>	NM 99/02118
<i>E. tenella</i> ARI-11/98	MN 98/02795

[0024] Las cepas de *Eimeria* de la presente invención pueden reproducirse mediante procedimientos estándares de la técnica, como el pasaje a través de un ave no infectada y no sometida a tratamiento previo (es decir, que no presentan infección de

*Eimeria*). Se puede producir cada cepa en un ave no infectada, recuperando los oocistos, opcionalmente esporulados y combinándolos entonces con un portador y/o excipiente. Las cepas de *Eimeria* se pueden cultivar en huevos según los procedimientos estándares y recuperar los oocistos de los huevos. Las cepas de *Eimeria* pueden adaptarse de manera rutinaria al crecimiento y reproducción en huevos por medios convencionales.

[0025] Los oocistos y/o esporocistos de las cepas de *Eimeria* según la invención pueden congelarse (criopreservarse) en nitrógeno líquido para su almacenamiento según los métodos conocidos en la técnica, como los expuestos en M. W. Shirley, *Biotechnology Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research* pp 97- (1995) ISBN 92-827-4970-3. A modo de ejemplo, los esporocistos suspendidos en un medio enriquecido con proteínas pueden congelarse en nitrógeno líquido en presencia de sulfóxido de dimetilo o glicerol, como de un 1 a un 10% p/p.

[0026] La presente invención se describirá ahora en relación con los siguientes ejemplos sin carácter limitativo:

#### **EJEMPLO1**

[0027] Se recogió un gran número de aislados de *Eimeria* de bandadas de pollos no comerciales (de granja) en Queensland de diversa patogenicidad. Los aislados eran generalmente poblaciones mixtas de especies de *Eimeria*. Sin embargo, en la mayoría de los casos el organismo patógeno predominante lo constituía una única especie de *Eimeria*. Los aislados fueron clasificados mediante análisis microscópico en las respectivas especies seleccionadas de entre *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. tenella* y/o *E. necatrix*. Se utilizaron oocistos individuales de cepas de cada especie para infectar a aves no infectadas por *Eimeria* generalmente en un volumen de diluyente, como aproximadamente 1 ml. Se observaron las heces de esas aves para detectar oocistos utilizando la técnica de flotación con sal (M. W. Shirley, *Biotechnology Guidelines on Techniques in Coccidiosis Research* pp 1-25 (1995) ISBN 92-827-4970-3) y se recuperaron los oocistos.

[0028] Se infectaron aves no infectadas por *Eimeria* con hasta 2000 oocistos de las cepas purificadas para desarrollarlas. Estas aves fueron sacrificadas y examinadas para confirmar que las lesiones intestinales concordaban con las especies con las que había sido infectada el ave mediante los criterios mencionados arriba.

#### **Atenuación de las cepas**

[0029] Las cepas fueron atenuadas mediante pasaje seriado seleccionando las de desarrollo rápido. En resumen, las aves fueron infectadas con 1000-5000 parásitos y

vigiladas de manera que se recogieran por separado los primeros parásitos evacuados. Se repitió este proceso un número de veces (por ejemplo de 5 a 30 veces) y se seleccionaron progresivamente los parásitos que se desarrollaban más rápido; coincidiendo con esto, se presenta una disminución de su capacidad de multiplicarse en el intestino de los pollos y causar lesiones. Para muchos aislados, no se pudieron producir cepas precoces, las cepas eran extremadamente patógenas, presentaban una baja tasa de crecimiento, eran resistentes a los fármacos, y/o inestables. Estas cepas fueron descartadas. Al someter las cepas restantes a las pruebas de protección frente a la exposición a cepas heterólogas de las mismas especies, muchas cepas no proporcionaban una protección cruzada entre especies de *Eimeria* lo que resulta esencial para el desarrollo de la vacuna. De estas pruebas, se produjeron, de manera sorprendente, cuatro cepas de vacuna de *Eimeria* de las especies de *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. tenella* y *E. necatrix*, todas ellas son altamente protectoras frente a cepas virulentas de las respectivas especies, crecen a una velocidad que permite la producción de vacunas, no eran resistentes a los fármacos coccidiostáticos y son estables. Las cepas fueron designadas *E. maxima* ARI-73/97, *E. acervulina* ARI-77/97, *E. tenella* ARI-11/98, *E. necatrix* ARI-MEDNEC<sub>3</sub>+8 y *E. necatrix* MCK01.

**[0030]** Los oocistos fueron esporulados de la siguiente manera: se colocan las heces que contienen oocistos en una solución de dicromato de potasio. El dicromato actúa como bacteriostático. Se burbujea aire en la solución. El proceso tiene lugar en una incubadora a 30°C. El proceso de esporulación es verificado mediante la observación de los cambios en los oocistos bajo un microscopio óptico con un aumento mínimo de 100x. El tiempo de la esporulación es de entre 18 y 30 horas, según la especie. Tras la esporulación, las suspensiones se colocan en un refrigerador para la preparación de vacunas o su almacenamiento.

**[0031]** Cuando hay menos de 100 ml de heces y dicromato, se sitúan 50 ml de suspensión fecal en una placa de Petrie y se coloca en la incubadora a 30 °C. Hay suficiente área de superficie y una profundidad mínima para asegurar que el oxígeno se esparce por la mezcla y ocurre la esporulación.

**[0032]** Las cepas fueron criopreservadas, como mediante inmersión de los oocistos en un medio (un recipiente adecuado) en nitrógeno líquido.

## EJEMPLO 2

**[0033]** Se realizaron una serie de pruebas utilizando vacunas que contenían cada una de las cepas producidas en el Ejemplo 1, combinaciones de 2 a 4 de estas cepas, así como varias combinaciones de cepas de acuerdo con el Ejemplo 1 combinadas con otras cepas para dar lugar a una vacuna. Todas estas vacunas mostraron una



excelente protección frente a infecciones con cepas heterólogas de *Eimeria*, así como en el tratamiento de la infección de *Eimeria*.

**[0034]** En un experimento se combinaron esporocistos de *E. maxima* ARI-73/97 y *E. acervulina* ARI-77/97 en una vacuna con la cepa de Medichick de *E. necatrix*, y la cepa de Darryl de *E. tenella*. Se vacunó a las aves con una vacuna que contenía 250 oocistos esporulados de cada cepa combinada en 1 ml de solución salina.

**[0035]** Se mantuvo a las aves sobre suelos sólidos en jaulas de alambre durante 21 días para prestar asistencia en la reinfección con los oocistos excretados. Se suministró agua y alimento *ad lib* a lo largo de la prueba.

**[0036]** Todas las aves fueron pesadas individualmente y marcadas mediante el corte de alas en el momento de la prueba. Los grupos de aves de control positivo susceptibles y vacunados fueron expuestos a 6000 cepas heterólogas de oocistos esporulados de cepas de *Eimeria* de Ingham de *E. tenella* y *E. necatrix*, y cepas de Medichick (*E. maxima* y *E. acervulina*) o 6000 oocistos de cepas homólogas. Se comparó el aumento de peso y la morbilidad entre aves infectadas de los distintos grupos de tratamiento y grupos de control no infectados después de 12 días. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se utilizaron modelos ANOVA (análisis de la varianza) apropiados para los diseños para analizar los efectos del tratamiento para relevancia estadística.

**Tabla 1**

Ensayo en corral para comparar el aumento de peso en vivo medio en aves vacunadas según lo arriba expuesto y aves susceptibles al enfrentarlas a $6 \times 10^3$ oocistos cada una de cepas de Medichick de <i>E. acervulina</i> y <i>E. maxima</i> y cepas de Ingham de <i>E. tenella</i> y <i>E. necatrix</i> o $6 \times 10^3$ oocistos cada una de cepas homólogas de los 4 parásitos.				
Grupo de tratamiento (6 reproducciones)	Dosis de vacuna tetravalente	Dosis de la exposición <sup>2</sup>	Número de aves sacrificadas durante la prueba debido a síntomas clínicos	Aumento de peso medio (gramos por ave) <sup>3</sup>
1	25 oocistos de cada	$6 \times 10^3$ oocistos de cada cepa	0/18	148 <sup>b</sup>

	una de las 4 especies	heteróloga		
2	25 oocistos de cada una de las 4 especies	6 x 10 <sup>3</sup> oocistos de cada cepa homóloga	0/18	227 <sup>a</sup>
3	Cero	6 x 10 <sup>3</sup> oocistos de cada cepa heteróloga	4/18	28 <sup>d</sup>
4	Cero	6 x 10 <sup>3</sup> oocistos de cada cepa homóloga	3/18	78 <sup>c</sup>
5	Cero	cero	0/18	201 <sup>a</sup>
LSD (P=0,05)	-	-	-	36
<sup>1</sup> medido 12 días después de la exposición <sup>2</sup> dada el día 21 tras la vacunación <sup>3</sup> las medias de las columnas seguidas de letras comunes en exponente no difieren significativamente en el nivel del 5%.				

**[0037]** Como se muestra en la Tabla 1, todos los grupos vacunados tienen un aumento de peso significativamente mayor tras exponerse a las cepas heterólogas u homólogas que las aves no vacunadas. No se observaron síntomas clínicos de infección de *Eimeria* en las aves vacunadas, en comparación con las aves no tratadas.

**EJEMPLO 3**

**[0038]** Se preparó una vacuna que comprendía *E. maxima* ARI-73/97 (15 oocistos), *E. acervulina* ARI-77/97 (25 oocistos), *E. tenella* ARI 11/98 (25 oocistos) y *E. necatrix* MCK01 (15 oocistos) por dosis de vacuna. Se utilizó la vacuna en un ensayo para medir el peso corporal y la estimulación inmunológica de las aves sometidas a inmunización, en comparación con aves de control no vacunadas. De los cuatro grupos de aves sometidos a la prueba, el primero recibió la vacuna mediante gotas en los ojos, al segundo se le administró por vía oral con el alimento, al tercero por vía oral con el agua, y el cuarto era el grupo de control. Se mantuvo a las aves en corrales con suelos sólidos y se les crió con alimento y agua *ad libitum*, y luz y calor proporcionado por lámparas.

[0039] Tras la vacunación, todos los grupos de aves vacunados al día siguiente de nacer o a los seis días tenían una tasa de crecimiento similar al compararlos con los controles no vacunados. Esto indica que la vacuna no afecta a la tasa de crecimiento, subrayando así su utilidad. Se expuso a las aves a cepas de *Eimeria* con diez veces el número de oocistos utilizados para la vacunación.

[0040] Las aves no vacunadas y expuestas presentan una producción de oocistos significativamente más alta, lo cual es característico de la propagación de la infección de *Eimeria* entre las aves. El número notablemente reducido de oocistos producidos por las aves vacunadas demuestra una respuesta inmunizadora protectora.

[0041] El grupo no vacunado mostró una caída en la tasa de crecimiento tras la exposición, mientras que las aves vacunadas continuaron ganando peso. De nuevo, esto demuestra la respuesta inmunizadora protectora.

#### EJEMPLO 4

[0042] Se preparan composiciones de vacuna que comprenden oocistos esporulados de las cepas arriba mencionadas mediante suspensión de los oocistos esporulados en solución salina amortiguada con fosfato de Dulbecco A (Oxoid Laboratories, Heidelberg, Melbourne, Australia) con pH 7,4, conteniendo un 0,1% de formaldehído. Se utiliza el mismo número de oocistos esporulados para cada cepa de *E. maxima* ARI-73/97, *E. acervulina* ARI-77/97, *E. tenella* ARI-11/98, y *E. necatrix* ARI-MEDNEC3+8, y/o *E. necatrix* MCK01.

[0043] La vacuna para administración oral comprende 500 dosis por ml, conteniendo 90 oocistos por dosis.

[0044] La vacuna para administración ocular comprende 40 dosis por ml, conteniendo 108 oocistos por dosis.

[0045] A lo largo de la presente descripción, a menos que el contexto exija lo contrario, la palabra “comprender”, o variaciones de la misma como “comprende” o “comprendiendo” o el término “incluye” o “contiene” y las variaciones de los mismos, se entenderán como la inclusión del elemento mencionado, o del entero o grupo de elementos o enteros, pero no como la exclusión de cualquier otro elemento o entero o grupo de elementos o enteros. A este respecto, al interpretar el ámbito de las reivindicaciones, deberá entenderse que un modo de realización en el que se añadan uno o más aspectos a cualquiera de las reivindicaciones se encuentra dentro del ámbito de la invención puesto que los aspectos esenciales de la invención, como se exponen en la reivindicación, se incluyen en dicho modo de realización.

**Reivindicaciones**

1. Una vacuna que contiene de tres a cinco cepas de vacuna de *Eimeria* seleccionadas de entre *E. maxima* ARI-73/97 (NM 98/02796), *E. acervulina* ARI-77/97 (NM 98/02794), *E. tenella* ARI-11/98 (NM 98/02795), *E. necatrix* MCK01 (NM 98/02797) y/o *E. necatrix* ARI MEDNEC<sub>3+8</sub> (NM 99/02118), junto con un excipiente o portador aceptable para su uso veterinario; en la que el número entre paréntesis representa el número de orden bajo el que se depositaron las cepas ante los Laboratorios Analíticos del Gobierno Australiano según el Convenio de Budapest.
2. La vacuna de la reivindicación 1, la cual incluye al menos una cepa adicional de *Eimeria* no atenuada.
3. La vacuna de la reivindicación 1, la cual incluye *E. maxima* ARI-73/97, *E. acervulina* ARI 77/97, *E. tenella* ARI-11/98, y una o ambas de *E. necatrix* MCK01 y *E. necatrix* ARI-MEDNEC<sub>3+8</sub>.
4. La vacuna de la reivindicación 1, la cual incluye una o más cepas de vacuna de *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. praecox*, *E. maxima*, *E. acervulina*, *E. necatrix* y/o *E. tenella*.
5. La vacuna de la reivindicación 1, la cual incluye una vacuna contra otra enfermedad de las aves de corral.
6. La vacuna de la reivindicación 5, la cual incluye componentes de vacuna eficaces contra una o más enfermedades de la enfermedad de Marek o infecciones por micoplasma o salmonela.
7. La vacuna de la reivindicación 1, en la que dichas cepas se encuentran en forma de oocistos o esporocistos esporulados enteros y/o fragmentados.
8. La vacuna de la reivindicación 1, la cual comprende de 15 a 500 oocistos esporulados por dosis.
9. Una cepa de *Eimeria* seleccionada del grupo formado por *E. maxima* ARI-73/97 (NM 98/02796), *E. acervulina* ARI-77/97 (NM 98/02794), *E. tenella* ARI-11/98 (NM 98/02795), *E. necatrix* MCK01 (NM 98/02797) y *E. necatrix* ARI MEDNEC<sub>3+8</sub> (NM 99/02118); en la que el número entre paréntesis representa el número de orden bajo el que se depositaron las cepas ante los Laboratorios Analíticos del Gobierno Australiano según el Convenio de Budapest.
10. La cepa de *Eimeria* de la reivindicación 9 en forma de un oocisto o un oocisto esporulado.