

P - 5850

Nº-45510-Case 11337.



1947

178631

30 SEP. 1947

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL

178631

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

P A T E N T E D E I N V E N C I O N

en

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de AMERICAN CYANAMID COMPANY, entidad norteamericana, establecida en 30 Rockefeller Plaza, Nueva York, N.Y., Estados Unidos de América, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA LA INMUNIZACION DE LOS CERDOS
CONTRA EL COLERA PORCINO".

-0-

Este invento se refiere al arte de inmunizar cerdos contra el cólera porcino. Más particularmente se refiere el invento a un nuevo método de obtener una vacuna inmunizante de virulencia reducida que, inyectada en cerdos, da origen a una producción adecuada de anticuerpos protecto-

5



178631

res sin someter al animal a los peligros inherentes al uso de vacunas que contienen el virus normal virulento del cólera porcino. El invento incluye también la nueva vacuna y su uso.

5 Aunque el cólera porcino se reconoce como enfermedad independiente desde hace más de medio siglo, no se han encontrado todavía medios para curar a un animal infectado. La enfermedad, que está esparcida por todo el mundo causa enormes pérdidas económicas. Las piaras infectadas de cerdos
10 no inmunes sufren una mortalidad entre el 85 y el 95%. Se propaga por las inmundicias que contienen cerdo infectado, por la introducción de nuevas reses infectadas en la piara, por "estallidos" que siguen al uso del suero-virus para vacuna y acaso también por otros medios.

15 El cólera porcino es una enfermedad septicémica aguda caracterizada por fiebre alta que se desarrolla después de un periodo de incubación de cuatro a cinco días, hinchazón inflamatoria de la conjuntiva y las glándulas linfáticas y numerosas lesiones hemorrágicas que pueden ocurrir en muchas
20 partes de cuerpo o en todas. Se ha dado cuenta de otros varios síntomas. Estos se complican a menudo por la acción de invasores secundarios, tales como Salmonella y Pasteurella. Sin embargo, un veterinario competente puede diagnosticar con acierto la enfermedad sin gran dificultad.

25 La única manera práctica de controlar el cólera porcino es inmunizar a los animales. La inyección de anticuerpos desarrolla una inmunidad pasiva de unas cuantas semanas de duración, pero evidentemente esto solo no sirve más que

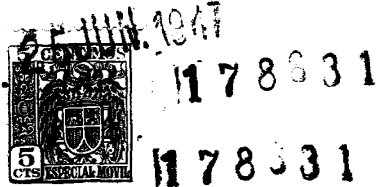


178631

para controlar una epidemia en una localidad. Para obtener una
inmunidad que dure toda la vida se ha considerado necesario in-
yectar el virus causativo viviente en el cerdo y dejarle produ-
cir sus propios anticuerpos. Como la inyección de virus infec-
cioso haría por sí sola que el cerdo padeciera el cólera porcino,
5 es necesario inyectar al propio tiempo una cantidad de suero de
cerdo hiperimmune. Por esta vacuna combinada de virus y suero la
acción antigénica del virus pueda desarrollar la inmunidad en
el cerdo, al paso que los anticuerpos del suero hiperimmune per-
10 miten que el animal sobreviva a la infección del virus.

El procedimiento de suero y virus para inmunizar
cerdos tiene cierto número de grandes desventajas, pero, aun
así, es el método que se elige en el día de hoy. No es difícil
producir virus para usarlo en estos procedimientos, pero sí
15 lo es la producción de suero. Numerosas reglas y reglamentos
estrictos del Ministerio de Agricultura de los Estados Unidos
rigen la producción de los sueros inmunizadores. Para prepa-
rar suero hiperimmune es necesario primero inmunizar cerdos
por una inyección de suero y virus combinado. A estos cerdos
20 se les inyecta por vía intravenosa grandes cantidades de virus
por lo menos noventa días para la inmunización. Diez días des-
pués de la hiperinmunización el animal puede ser sangrado para
obtener suero hiperimmune. Después pueden hacerse no más de
tres sangrías adicionales. Entonces el animal se considera inú-
25 til y se dispone de él. La dificultad del procedimiento y el
volumen limitado de suero obtenido de cada cerdo, hacen eviden-
tes los muchos inconvenientes inherentes a aquél.

Otra desventaja sería del presente procedimiento



da virus y suero está en el mismo hecho de que se administra al cerdo un virus infeccioso virulento. El virus se propaga en el animal y se excreta, ofreciendo así una fuente de infección para cerdos no tratados ni inmunes. Podría decirse de hecho que el mismo tratamiento tiende a mantener la enfermedad. Puede haber poca esperanza de extirparla totalmente mientras se emplee el método del suero y el virus.

Otra desventaja sería del presente procedimiento de virus y suero se ha mencionado ya arriba. A menudo, por errores de producción que no pueden evitarse por completo el suero puede no contener bastante de las sustancias de anticuerpos para impedir la infección patológica del animal por el virus empleado en la vacuna. Como resultado, los animales vacunados pueden sucumbir a la enfermedad. Esta circunstancia se conoce como "estallido" de suero. Análogamente, el virus usado puede atenuarse o hacerse menos virulento que lo necesario, y como resultado la inmunidad natural no se desarrolla. La inmunidad pasiva derivada del suero inmune pronto desaparece y el cerdo está entonces sujeto a infección.

Se han hecho muchas tentativas para evitar la necesidad de usar una forma virulenta del virus. La mayoría de ellas se han dirigido a producir un virus atenuado o cierta forma de virus modificada física o químicamente que sea antigénica pero no lo bastante virulenta para producir los plenos efectos de la enfermedad en el cerdo. Prácticamente, ninguna de las preparaciones de virus modificadas por medios físicos o químicos han sido de valor para producir inmunidad. Algunas vacunas que contienen agentes modificadores, tales como violeta

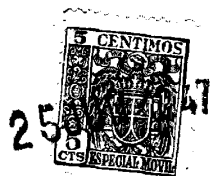


178631

de cristal o aceite de eucalipto, se han preparado y empleado con diversos grados de éxito. Pero estos productos tienen muchas desventajas propias.

Las tentativas de preparar una forma atenuada
5 menos virulenta del virus contra el cólera porcino propagando el virus en otra especie de animal, a la manera como el virus del moquillo de los perros que atenua por cultivo en hurones, han fracasado también. Una de las principales dificultades
10 está en el hecho de que, a diferencia de muchos agentes infecciosos, el virus del cólera porcino es específico de los cerdos, y no se propaga en circunstancias ordinarias en la mayoría de otros animales. Los esfuerzos para propagar el virus en otros animales tan divergentes como ratones, ratas, conejos de Indias, conejos, perros, gatos, caballos, asnos, bueyes,
15 cabras, palomas, gallinas y otros han demostrado que estos animales no son receptivos del virus del cólera porcino. También se ha descubierto que el virus del cólera porcino no se propaga en huevos incubados.

Aunque el virus del cólera porcino se ha transmitido a varios animales por inoculación estos animales dejaron
20 de manifiestar fiebre alta, lesiones y otro indicio de enfermedad. El virus se encontró en la corriente sanguínea de algunos de estos animales, en especial ruminantes, varios días más tarde. Cuando dicha sangre se defibrinó e inyectó en cerdos
25 susceptibles, estos desarrollaron síntomas típicos del cólera porcino. En ningún caso pareció modificada la patogenidad del virus para el cerdo. El bajo contenido en virus de la sangre indicaba meramente una dilución de la materia originaria.



178631

258

En una serie de experimentos se inyectó a ovejas el virus de la fiebre porcina. Siete días más tarde 2 cm³ de sangre de una oveja se inyectaron en una segunda oveja y este procedimiento continuó durante una serie de 10 pasos. Los

5 cerdos inoculados con sangre de la oveja murieron todos después de mostrar síntomas típicos de fiebres porcinas. Ninguna de las ovejas manifestó síntomas de enfermedad ni el virus pareció atenuado en ninguna medida. La producción de anticuerpos en el suero de las ovejas no pudo demostrarse.

10 A pesar del fracaso de muchos investigadores para establecer el cólera porcino en varios animales experimentales para obtener de ellos un virus atenuado de baja virulencia pero con la propiedad de producir anticuerpos en cerdos, finalmente

15 hemos conseguido este resultado mediante la técnica que describiremos a continuación. Con nuestro nuevo procedimiento es posible inocular a animales que no sean cerdos el organismo virulento del cólera porcino y, después de un número relativamente grande de pasos en serie por el animal, obtener un virus de

20 modificadas propiedades tales que, inyectado a cerdos, dé origen a la producción de anticuerpos eficaz en la inmunización de los cerdos contra el cólera porcino, pero no produce los fatales síntomas patológicos inherentes al cólera porcino normal. Por tanto, la inyección del virus modificado a cerdos susceptibles dará por resultado su inmunización; así se evita el uso

25 de preparados de virus virulentos y de sueros hiperinmunes.

Para crear el virus en animales experimentales, es necesario seguir ciertos procedimientos. Según el nuestro, un animal adecuado, por ejemplo, un conejo se inyecta con virus



2

178631

de cólera porcino de virulencia conocida. Como se ha dicho antes, el conejo no tiene fiebre ni presenta síntomas de enfermedad, aunque el virus puede descubrirse en su corriente sanguínea unas horas después de la inoculación. Al cabo de un
5 periodo de uno a seis días aproximadamente después de la inoculación se sacrifica el conejo y se le quita el bazo. Este, preparado como se describirá después, se encontrará que contiene virus bastante para inocular a un cerdo y provocar así en el animal el cólera porcino típico. Se escoge el bazo con
10 preferencia en los primeros pasos por conejos porque parece tener una concentración de virus. Otros órganos como el cerebro, el hígado etc, o aún la misma sangre, pueden también contener lo bastante del organismo virulento para producir la enfermedad en cerdos no inmunes.

15 Aunque el primer conejo deje de desarrollar síntomas de enfermedad, los desarrolla el cerdo inoculado. Al cabo de dos a cinco días el cerdo febril se sacrifica y se hace una suspensión de su bazo y el virus se inyecta a otro conejo. Este procedimiento de inoculación de cerdo a conejo a cerdo a
20 conejo se repite hasta que eventualmente el conejo comienza a mostrar signos de fiebre. La preparación del bazo infeccioso del conejo puede luego inyectarse intravenosamente a otros conejos con un paso ocasional por un cerdo hasta que el virus está tan adaptado que la sangre de un conejo inyectada en otro
25 dé lugar a una fiebre alta y persistente. Después de muchos pasos por conejos, por lo menos 5 y con preferencia 20 o más el virus se ha modificado de carácter de tal manera que ya no produce los plenos efectos patológicos del cólera porcino



178631

cuando se inyecta a cerdos susceptibles. A pesar de su escasa virulencia, el virus es antigénico y da origen a la producción de anticuerpos que inmunizan al cerdo para toda su vida.

No está claro el mecanismo exacto por el cual se produce el virus no virulento en los conejos. Una explicación posible, pero a la cual no queremos aferrarnos, parece basarse en la hipótesis de que entre los millones de formas de virus que están presentes en una sola inoculación de virus virulento del cólera porcino en el conejo, hay algunas que pueden adaptarse a la propagación en el conejo. Como la forma virulenta del virus no puede propagarse en el conejo, esta forma es la primera en morir. Indudablemente, estas pocas formas de virus que aparentemente pueden sobrevivir durante un período más largo en el conejo formas que pueden ser mutantes, parecerían igualmente en el conejo con el tiempo. Cuando se quita el bazo y se convierte en una inoculación para el cerdo, contiene una proporción de la raza mutante más alta de la que hacía originariamente en la inoculación usada para el conejo. De vuelta en el cerdo, ambas razas de virus se propagan y aumentan en tal número que pueden de nuevo recogerse y usarse para inocular a otro conejo. Como se verá por transferencia repetida de cerdo a conejo a cerdo etc, es posible componer una proporción relativamente alta de la raza mutante al paso que se disminuye la proporción de la raza más virulenta. Por consiguiente después de un número suficiente de pasos por conejos, la preparación contiene apenas lo bastante de la forma virulenta para determinar el cólera porcino en un cerdo. Pero la raza mutante no patogénica se propaga fácilmente, y, cuando se

25



178631

inyecta en el cerdo determina producción de anticuerpos sin desarrollo de los síntomas patológicos.

Para ilustrar el nuevo procedimiento, el bazo de un cerdo infectado extraído a un animal sacrificado al sexto día de la inoculación con virus de cólera porcino, se puso en suspensión al 10% en líquido salino en un triturador de Ten Broeck. La suspensión se centrifugó durante cinco minutos a 1.000 r.p.m., y 3 ml. de lo que sobrenadaba de ella se inoculó a un conejo por vía intravenosa. El conejo no mostró aumento de la temperatura corporal pero fué sacrificado al tercer día después de la inoculación y una suspensión al 10% de su bazo se inoculó a un cerdo. Este último mostró fiebre de hasta 40-41°C en los días segundo, tercero y cuarto después de la inoculación, y fué sacrificado al quinto día. Una suspensión de este bazo se inyectó a su vez a un conejo. El virus fué transferido por medio de esta técnica de alternación y entre el cerdo y uno o dos pasos de conejo hasta que se hubo realizado en seis pasos intermitentes por conejos. De siete de estos inyectados con el virus del sexto paso tres mostraron ligera elevación de temperatura al segundo día de la inoculación, y fueron sacrificados entonces. Sus bazos fueron reunidos y suspensiones de ellos se inyectaron intravenosamente a otros grupos de conejos. Estos animales reaccionaron de nuevo con una ligera fiebre y fueron a su vez sacrificados, y luego el virus se transcribió para dos pasos más por conejos. En este periodo ninguno de los conejos mostró elevación de temperatura en las comprobaciones corrientes, ni se descubrió virus en sus bazos por subinoculación de cerdo.



178631

Resultó evidente por la desaparición del virus en los pasos por conejos que aquél o bien se transfería meramente de un conejo a otro sin proliferación o que el bazo se extraía en un tiempo durante el cual el virus no estaba presente en forma infecciosa. Para comprobar esta última posibilidad, una suspensión de bazo de conejo que representaba el tercer paso por conejos se inyectó a tres de estos, cuyas temperaturas se tomaron cada dos-tres horas durante las veinticuatro horas del día en los siguientes cinco días. Los tres conejos reaccionaron con respuesta febril a la segunda noche de la inoculación. Lo curioso fué que la temperatura elevada sólo subsistía 2-3 horas, después de las cuales empezaba a caer. Los animales fueron sacrificados durante este periodo febril y una mezcla de sus bazos inyectada en cerdos resultó contener el virus del cólera porcino. Adoptando la técnica descrita de tomar temperatura cada dos o tres horas día y noche, el virus se llevó a través de varios pasos por conejos por transferencia de bazo.

Para establecer la identidad del virus, un cerdo inyectado con el virus de sexto paso por conejos reaccionó con un periodo febril de seis días pero sobrevivió, y se puso luego en contacto con dos cerdos que estaban enfermos después de la inyección de una raza conocida de virus virulento de cólera porcino. Los animales inyectados se mantuvieron en una pocilga sucia con dos cerdos de control de contacto normales. Los dos animales inyectados con la raza del virus murieron y los dos cerdos de control mostraron fiebre a los cinco y seis días de contacto respectivamente, y luego murieron a los doce



178631

y a los diecinueve días. Al practicar la autopsia se observaron lesiones típicas de cólera porcino, al paso que el cerdo inyectado con el virus del sexto paso por conejos, permaneció sin síntomas durante los treinta días del periodo de observación.

5 Más tarde, cuando se le aplicó a este cerdo un virus de virulencia conocida, resistió la infección, al paso que los cerdos de control murieron. Los cerdos inyectados con el virus de bazo de los pasos octavo y noveno por conejos que enfermaron se sometieron a autopsia después de la muerte y se observaron le-

10 siones típicas de cólera porcino. Evidentemente el virus de cólera porcino estaba siendo mantenido por los pasos por conejos pero no se había atenuado lo bastante por el número relativamente bajo de pasos.

Siendo más conveniente usar sangre infectada como

15 fuente de inoculación que el preparar suspensiones de bazo u otros órganos, el uso de sangre infectada se adoptó pronto una vez que se estableció el virus por conejos. La sangre puede usarse en la inoculación inicial si la concentración y virulencia del virus son lo bastante altas. La sangre de un cerdo que

20 se había puesto febril al quinto día de inocularle una suspensión de bazo de un virus pasado por ocho conejos se desfibrinó y se inyectó en la vena de la creja de otro conejo. Este contrajo fiebre a las veinte horas después de la inoculación.

La sangre de este conejo febril se desfibrinó y

25 se inyectaron 2 ml. en cada uno de tres conejos por vía intravenosa. Dos de los animales tuvieron fiebre y su sangre también se desfibrinó y pasó a otro grupo de conejos. La sangre de los que contrajeron fiebre se continuó después en otros

MALA REPRODUCCION
POR DEFECTO DEL ORIGINAL



11. 1947

178631

conejos. De este modo es posible transferir el virus de conejo a conejo en muchos pasos.

Debe entenderse, por supuesto, que no todos los conejos inculados tienen temperaturas por encima de lo normal.

- 5 También puede variar considerablemente el tiempo requerido para el desarrollo de un estado febril, de unas 8 horas a 5-6 días. Para los mejores resultados, la sangre usada para preparar inoculaciones para el paso en serie debe extraerse durante el período febril o por lo menos poco tiempo antes o después.
- 10 La duración de la fiebre variará también considerablemente desde unas cuantas horas a unos días.

La transferencia del virus al conejo se hace con preferencia por vía intravenosa, aunque esto no significa excluir otros medios.

- 15 La preparación de inoculaciones de tejidos o de sangre es una cuestión relativamente sencilla muy propia de la habilidad del arte. Daban darse los tejidos, el fibrinógeno, y toda materia que pueda estorbar la inoculación o causar reacciones indeseables. La congelación y el deshielo de la preparación pueden ayudar a libertar el virus de materia extraña.
- 20 La concentración del virus por los medios conocidos es también una variación posible en el procedimiento dentro de la finalidad del invento.

- 25 Como se verá, el nuevo procedimiento incluye las operaciones de inocular animales no susceptibles ordinariamente de infección con el virus del cólera porcino y al cabo de un período de tiempo preparar una inoculación del tejido animal o sangre y luego inyectar el virus en un cerdo normal. Este



178631

5 procedimiento se repite hasta que el virus puede mantenerse en el animal durante un gran número de pasos en serie. El virus obtenido por estos pasos a animales en serie parece ser menos virulento para el cerdo pero tiene la facultad de dar origen al desarrollo de anticuerpos protectores en el cerdo.

Esta solicitud que corresponde a la presentada en los Estados Unidos de América, el 12 de septiembre de 1946, bajo el número 696.617, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

10

- O - N O T A - O -

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

15 1º. - Un procedimiento de establecer el crecimiento del virus del cólera porcino en animales salvo los cerdos, por ejemplo, conejos, caracterizado por las operaciones de inocular a otro animal en el cual no se propaga ordinariamente el virus del cólera porcino, una raza normal de virus de este cólera, preparar una inoculación de este otro animal después
20 de un periodo de uno a seis días aproximadamente, e inyectarla a un cerdo no inmune, dejando que el virus así transferido se propagara en el cerdo; preparar otra inoculación del cerdo e inyectar la preparación de virus en un segundo animal de los

25



47

178631

mencionados y repetir estos pasos alternados del virus hasta que el mismo se ha modificado de tal manera que se propagará en dicho animal sin retorno del virus a su huésped normal en el cerdo.

5 2º. - Un procedimiento de establecer el crecimiento del virus del cólera porcino en animales distintos del cerdo, por ejemplo, en conejos, caracterizado por la operación de inocular a estos animales en que el virus del cólera porcino no se propaga ordinariamente virus muy virulento de este
10 cólera y al cabo de un periodo de uno a seis días aproximadamente retirar virus del otro animal e inocular a un cerdo no inmune una cantidad suficiente del virus para infectar al cerdo, dejando así que se propague el virus transferido al cerdo, retirar una cantidad de virus de este cerdo, e introducir
15 a en un segundo animal de otra clase, y, después de un periodo de uno a seis días aproximadamente, retirar el virus del segundo animal e inyectarlo a un segundo cerdo no inmune y repetir este procedimiento de alternar el virus de animal a cerdos hasta que el virus está tan modificado que se propague
20 en el animal sin volver a un cerdo y continuar el paso de virus de animal a animal hasta que el virus se ha modificado tanto que ya no desarrolla síntomas patológicos cuando se inyecta a un cerdo normal, pero dará origen a la producción de anticuerpos protectores.

25 3º. - Un procedimiento según se reivindica en los puntos 1º o 2º, caracterizado por el hecho de que la inoculación del otro animal, por ejemplo, un conejo, se prepara extrayendo el bazo de dicho animal y preparando de él una vacuna.



178631

308

5 4^a. - Un procedimiento de inmunizar cerdos contra la infección por el virus virulento del cólera porcino, caracterizado por las operaciones de inyectar a cerdos no inmunes una vacuna que comprende virus de dicho cólera modificado por el paso por animales en serie en tal medida que el virus inyectado a cerdos normales da origen a la producción de anticuerpos protectores, pero no determina el desarrollo de síntomas patológicos de cólera porcino en el cerdo.

10 5^a. - Un procedimiento según se reivindica en el punto 4^a, caracterizado por el hecho de que la vacuna se prepara por el paso en serie a través de animales en que el cólera porcino no se propaga ordinariamente, por ejemplo, conejos.

15 6^a. - Un procedimiento según se reivindica en los puntos 4^a o 5^a, caracterizado por el hecho de que la vacuna es modificada por lo menos por veinte pasos por animales en serie.

7^a. - Un procedimiento para la inmunización de los cerdos contra el cólera porcino.

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

Esta Memoria consta de quince hojas escritas por una sola cara.

Madrid, 30 SEP. 1947

P. A.
Alberto de Elzaburu
Por Poder