

202131

----- P.- 9752.-
Nº. 61766 Case 89.796.



3 MAR. 1962

MEMORIA DESCRIPTIVA

para solicitar

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

e n

E S P A Ñ A

por VEINTE años

a nombre de FORT DODGE LABORATORIES, INC., entidad norteamericana, establecida en 908 First Avenue South, Fort Dodge, Iowa, Estados Unidos, por:

"UN PROCEDIMIENTO PARA PREPARAR UNA VACUNA CONTRA EL COLERA PORCINO".

Esta invención se refiere a una vacuna para la prevención y tratamiento del cólera porcino y a un método para preparar dicha vacuna.

5 En la represión del cólera porcino, el primer método eficaz para inmunizar al cerdo contra el cólera porcino, método desarrollado por Dorset y otros dependía de utilizar el virus colérico del cerdo vivo, extraído de un



5 animal, contaminado con la enfermedad y aplicado simultáneamente con un antisuero contra el virus del cólera porcino. Este método depende del uso de variables cantidades de suero y de una dosis más o menos constante del virus, la variación en la dosificación del suero depende a su vez del peso del animal que debe ser inmunizado. A pesar de que el método confiere inmediata protección contra el cólera porcino, sin embargo, la inmunidad activa no es fuerte durante dos semanas aproximadamente. Esto, sin embargo, no es evidente porque la inmunidad pasiva protege al individuo o animal hasta que la inmunidad activa puede ser establecida.

10 Una desventaja sobresaliente de este método consiste en el hecho de que el virus vivo resulta constantemente sembrado al operar en la forma antes descrita, lo que constituye una fuente potencial de cólera porcino, en los animales susceptibles. Por añadidura, a veces el propietario del animal enfermo posee un falso sentido de seguridad después de la vacunación en la cual se ha usado virus de baja potencia, con lo que la inmunidad resultante es simplemente una inmunidad pasiva, que puede perderse en un plazo tan breve como el de veintiun días. No obstante, este método desde su iniciación en los comienzos del siglo XIX ha sido ampliamente aceptado y es ampliamente usado hoy todavía.

25 Reconociendo las deficiencias del método de inmunización arriba descrito, ulteriores investigaciones condujeron a nuevos métodos de investigación para obtener



vacunas mediante la denominada atenuación del virus, los procedimientos propuestos por Boyrton, Tille y otros implican el uso de productos químicos y calor dando como resultado generalmente o un tipo de atenuación en que el virus se vuelve incapaz de desarrollarse cuando se le inyecta en un cerdo susceptible o se destruye realmente el virus del cólera porcino. De este modo, en lugar de poseer un virus verdaderamente atenuado, capaz de reproducirse hasta el punto de garantizar una inmunidad para toda la vida, las vacunas anteriores dependían, para la inmunización del cerdo contra el cólera, de la base de cualidades antigénicas que posea el virus muerto. Estas vacunas no confieren protección inmediata, sino que requieren cuando menos siete días para estimular una inmunidad activa y la inmunidad resultante se ha encontrado que es algo transitoria- en otras palabras; la inmunidad no parece conservarse- y frecuentemente los cerdos necesitan ser revacunados después de seis meses y a intervalos periódicos posteriormente para garantizar la inmunidad. Este método no puede ser usado con seguridad en combinación con el suero anticolérico porcino, ni ha sido recomendado para su utilización dentro de las dos semanas siguientes al empleo del suero anticolérico porcino. Se ha encontrado también que los puercos así vacunados resultan frecuentemente hipersensibilizados para la infección y pueden enfermar, por causas distintas del cólera porcino, durante el periodo de inmunización.

El presente invento salva con éxito las defi-



ciencias que son inherentes a los anteriores métodos, brevemente descritos, ya que utilizando el procedimiento que describimos a continuación, se obtiene como producto de fuerza concentrada un virus para el cólera porcino, propagado entre puercos y atenuado entre conejos, el cual virus, en dosis relativamente pequeñas, es capaz de conferir a los puercos una inmunidad duradera contra el cólera porcino- en oposición con las vacunas anteriores- y sin necesitar el virus del cólera porcino virulento para obtener protección completa como hasta aquí se requería cuando se confiaba en los anteriores métodos de protección mediante el suero anticolérico porcino. Gracias a este invento se obtiene, por consiguiente, una protección completamente adecuada contra el cólera porcino y, por añadidura, el actual peligro de perpetuar el cólera porcino por inoculación de virus virulento en las granjas resulta completamente evitado.

Es conocido que puede obtenerse la atenuación virus del cólera porcino virulento haciéndole pasar a través de una serie de conejos, la atenuación se lleva a cabo mediante inyección intravenosa del virus colérico del cerdo en los conejos. Se toman diariamente la temperatura de los conejos y cuando se evidencia una elevación de temperatura, se sacrifican los conejos; se recogen su sangre, su bazo y otras visuras que, si son sólidas, se muelen finamente y una porción de este material es llevado a la forma de una suspensión salina e inyectado intravenosamente en un segundo grupo de conejos. Este grupo se sacrifica, a su



vez, cuando manifiesta una elevación de temperatura y se repite el mismo procedimiento como queda arriba reseñado. Este tránsito en serie se prolonga hasta que se obtiene el virus atenuado, generalmente se necesitan entre 13 a 15 ino-
5 culaciones en serie para asegurar la deseada atenuación.

Para determinar cuándo ha tenido efecto la atenuación es necesario inyectar una porción de la suspensión del tejido en maceración (si es este el utilizado) de cada paso por los conejos dentro del puerco susceptible de enfer-
10 mar del cólera porcino. Si la atenuación ha sido alcanzada, el puerco podrá manifestar fiebre, pero este será el único signo de su dolencia. Podemos denominar a esto, en tal caso, un virus contra el cólera porcino atenuado por conejos. A lo que parece, el virus colérico virulento resulta modifi-
15 cado al pasar serialmente a través de los conejos, convirtiéndose de un virus productor de enfermedad en otro incapaz de producirla. El virus permanece, sin embargo, viable y conserva todavía un factor antigénico y cuando se le inyecta en un puerco sensible a la epidemia, le estimula general-
20 mente para que produzca una inmunidad activa contra el cólera de su especie.

Se ha hallado sin embargo que sangre de conejo desfibrinada o una suspensión de tejidos conteniendo el virus colérico del cerdo, atenuado a través de conejos, carece
25 de importantes características. Este material posee desventajas bien definidas para la inmunización general del puerco. En primer lugar, la sangre o los tejidos del cone-



jo inyectados en el puerco pueden producir un shock por causa de su incompatibilidad. En segundo lugar, la concentración del virus atenuado en la sangre y los tejidos del conejo se ha manifestado como indeseablemente baja y por lo tanto, se necesitan cantidades relativamente amplias del mismo para obtener una inmunización satisfactoria. Como factor final- y dejando aparte la utilización del tejido o sangre de conejo para la inmunización- el rendimiento del material inmunizante resulta bajo, lo que exige el sacrificio de un considerable número de animales. Estos inconvenientes resultan naturalmente muy dispendiosos cuando se trata de obtener vacuna suficiente de aceptable concentración para la inmunización de cerdos en masa.

Tales inconvenientes fueron superados cuando se descubrió que puercos que habían sido inoculados con virus atenuado por conejos, formaban una concentración sorprendentemente alta de virus atenuado en su sangre y tejidos, como por ejemplo en el ba-zo, hígado, riñones, testículos etc. Se ha encontrado, además, que estos materiales con un tratamiento adecuado, podían ser empleado como vacuna de virus atenuado sumamente eficaz, ya que el virus no aumentaba de virulencia al ser inyectado en el puerco. Por tanto, en lugar del producto del conejo con baja concentración y bajo rendimiento, ha sido obtenida una vacuna propagada por cerdos altamente concentrada y en rendimiento mucho mayor. Por añadidura, este producto resulta naturalmente menos expuesto a producir shock por causa de su mayor compatibilidad.



En conformidad con este invento, virus del cólera porcino, atenuado por conejos, contenido en tejidos, bazo u otra víscera en suspensión o bien sangre disfibrinada del conejo es inyectado a un cerdo. Después de la inyección parenteral del virus, atenuado por conejos en el cerdo, se presenta generalmente dentro de los tres o cinco días siguientes una elevación de temperatura. Esta elevación de temperatura persiste de tres a cinco días, después de su aparición y en seguida desaparece. El cerdo no pierde el apetito.

10 Si un animal que manifiesta esta reacción febril es sacrificado en el segundo o tercer día a partir de la aparición de la fiebre, la sangre y cualquier tejido o víscera- o bien uno de ellos- albergará al virus atenuado y constituirá, por tanto, la fuente de obtención del producto deseado, el cual, si se le inyecta parenteralmente en puercos sensibles, estimulará a los mismos para que permanezcan activamente inmunes contra el cólera porcino. Este producto no solo resulta más compatible con el cerdo que el tejido del conejo sino que- lo que es más importante- contiene una mayor concentración de virus atenuado, lo que exige el empleo de cantidades relativamente pequeñas para alcanzar el efecto apetecido. Además, al efectuar la propagación del virus atenuado en el puerco, el rendimiento de virus es mayor por causa de las diferencias de tamaño relativas entre conejos y puercos.

25 Como un ejemplo específico del método para obtener el producto, objeto de este invento, el virus viru-



lento del cólera porcino se esteriliza bacteriológicamente y se inyecta por vía intravenosa a conejos. Las temperaturas se toman dos veces al día y cuando se advierte una elevación de temperatura, se sacrifican los conejos y sus bazo
5 son recogidos, macerados y puestos en suspensión en un diluyente tal como las disoluciones fisiológicas salinas, una porción de esta suspensión se inyecta después a un segundo grupo de conejos.

Estos se sacrifican a su vez cuando se evidencia una elevación de temperatura y se repite el mismo procedimiento en la forma arriba reseñada. Generalmente se obtiene la atenuación al pasar el virus a través del conejo
10 décimotercio. El virus del cólera porcino atenuado por conejos está ahora listo para inocularse en el puerco. El tejido del conejo se muele finamente, se forma con él una suspensión en sal fisiológica u otro diluyente, y se le inyecta parenteralmente en puercos susceptibles al cólera.
15 La dosificación puede variar en límites desde cerca de 1/4 c.c. de una suspensión de bazo al 1% hasta cerca de 10 c.c. de suspensiones de bazo en diluyente al 10%, en peso, basándose en la composición íntegra. En un plazo de tres a
20 cinco días, se observa una elevación de temperatura de 39° - 40°C, persistiendo dicha elevación entre tres a cinco días aproximadamente. En el segundo o tercer día a contar desde la aparición de la fiebre, es sacrificado el animal y
25 la sangre, tejidos y vísceras en general conteniendo el virus atenuado se separan para su tratamiento.



Se puede subrayar que es posible obtener el producto deseado sin sacrificar al animal. Por ejemplo, el cerdo puede ser sangrado a intervalos y la sangre, obtenida así puede ser usada para preparar el producto. Como método ulterior, el bazo puede ser extirpado quirúrgicamente, en condiciones asépticas, lo que evita la muerte del cerdo. Otro método ulterior consiste en utilizar cerdos machos inyectándoles virus atenuado en conejo, directamente en los testículos. En el segundo o tercer día, a partir de la aparición de la fiebre, los testículos son extirpados quirúrgicamente, en condiciones asépticas, para utilizarlos en la operación. Por tanto, este método suministra también una buena fuente de virus atenuado por conejos e inoculado en puercos sin sacrificio del animal.

Para obtener el deseado producto la sangre- si se utiliza- se desfibrina primeramente por medios ya conocidos y después se la esteriliza bacteriológicamente por adición por adición de fenol o de otras sustancias de actividad similar. Si se emplea tejido de puerco, el tejido es molido finamente y tamizado. El material fino obtenido puede ser, bien secado y más tarde reconstituido, o bien suspendido en un diluyente en el momento de usarlo, si así se desea, o puede ser inmediatamente adicionado a una disolución isotónica tamponada o mezclada con glicina, lactosa u otro disolvente adecuado. Por añadidura, otras sustancias activas o excipientes pueden ser incorporados al producto, si así se desea. Por ejemplo, puede realizarse una composi-



ción conveniente con cristal violeta y glicerol, empleando bien el virus atenuado en sangre de cerdo desfibrinada, o bien el suero sanguíneo transparente o bien los tejidos del cerdo finamente molidos.

5 Para obtener un producto estéril, libre de organismos contaminadores se adiciona un agente antibiótico, bacterioestático o bactericida en cantidad eficaz para destruir o evitar el desarrollo de organismos bacteriales. Son
10 útiles en este sentido antisépticos como el fenol, un colorante de acción bacteriostática o bactericida, una imida sulfanílica como sulfametacina, sulfameracina, sulfaquinoxalina etc. o prácticamente, cualquier agente antibiótico, bacterioestático o bactericida conocido. Como es natural
15 estas substancias se aplican en cantidades tales que su uso no resulte tóxico ni destruya el poder inmunizante del virus atenuado. Se ha encontrado que el empleo de dichas materias acrecienta esencialmente la longevidad del virus atenuado en
20 almacenaje y evita usuales infecciones secundarias en su uso. Aunque un colorante como violeta cristal, por ejemplo se ha
25 mostrado como especialmente eficaz, pueden aplicarse otros colorantes de naturaleza semejante como azul de metileno, acriflavina etc. En presencia de cerca de 1/2% fenol - o en mezcla con él - se ha conservado a la temperatura ordinaria de la cámara frigorífica sangre desfibrinada, durante cien días cuando menos. Incluso se obtuvieron más largas direcciones empleando 10% o más de un colorante bacterioestático. En ausencia de estos agentes de adición, la vacuna con



virus atenuado tiene que ser usada dentro de un breve periodo de tiempo después de su preparación, para obtener con ella resultados efectivos. Además, se cree que el uso de agentes adicionales resulta efectivo para prevenir infecciones secundarias con respecto a las cuales se manifiesta el puerco sensible, a veces después de su inmunización contra el virus del cólera porcino. Agentes antibióticos, bacterioestáticos o bactericidas e incluso glubulina gamma, bien aislados o mezclados entre sí, aplicados en asociación con el virus atenuado del cólera porcino con el doble propósito de inmunizarlo contra el cólera del cerdo y de protegerlo contra infecciones secundarias, coopera a la plena conservación de la salud del puerco, durante el tiempo que se está consiguiendo una sólida inmunidad contra el cólera porcino.

Otro agente activo que puede ser usado todavía en asociación con el virus atenuado del cólera porcino es el suero anticolérico, bien conocido que hemos mencionado anteriormente. Como ya indicamos, la práctica anterior para inmunizar puercos consiste en inyectar suero anticolérico para cerdos en unión de una inyección de virus colérico virulento. Si se desea utilizar este suero, ya sea para alcanzar una inmediata inmunidad pasiva y temporal contra el cólera o para prevenir infecciones secundarias, se ha comprobado que pueden obtenerse excelentes resultados sin usar el virus colérico virulento, utilizando los productos de virus atenuados, propios de este invento, en conjunción



con el suero anticolérico.

Los ejemplos siguientes representan casos ulteriores ilustrativos de la presente invención:

EJEMPLO I

5 Se preparó una suspensión al 10%, esterilizada de bazo de cerdo, conteniendo virus colérico porcino, atenuado por conejos y propagado por cerdos, para lo que se tritura el bazo - en una máquina trituradora de tejidos - con solución salina fisiológica hasta obtener una suspensión
10 homogénea. A partir de esta suspensión de bazo al 10% se prepararon diluciones décuplas en serie, en solución fisiológica salina esterilizada, adicionando 1 cc. de la suspensión al 10% a 9 c.c. de la solución fisiológica salina esterilizada, mezclando y transfiriéndolas hasta que se hubie-
15 ron preparado diluciones en serie desde 1 por 100 hasta 1 por 1.000.000.

 Se inyecta subcutáneamente en la axila de cerdos sensibles a la epidemia 1 cc. de las diluciones en serie 1 por 10.000, 1 por 100.000 y 1 por 1.000.000, a cuatro
20 cerdos por cada dilución. Las temperaturas rectales de los puercos se toman cotidianamente durante veintiun días. Durante este periodo, cuatro de los cuatro cerdos inyectados con la disolución de 1 por 10.000, tres de los cuatro cerdos inyectados con la disolución de 1 por 100.000 y dos de
25 los cuatro cerdos inyectados con la disolución de 1 por 1.000.000 manifestaron temperaturas elevadas.

Veintiun días después de la inyección de las



disoluciones de bazo de cerdo se puso a prueba la resistencia de todos los puercos mediante la inyección de 2 c.c. de sangre con virus de cólera porcino virulento. Un cerdo que había recibido la dilución al 1 por 1.000.000 sucumbió después de la prueba. Todos los otros cerdos sobrevivieron sin señales de cólera.

Sobre esta base se ha deducido que la dosis inmunizante mínima de virus de cólera porcino propagado en cerdos y atenuado en conejos, es del orden de 1 c.c. de una dilución al 1 por 100.000 a 1 por 1.000.000.

EJEMPLO II

Puercos con similar susceptibilidad fueron inyectados subcutáneamente en la axila con 1 cc. de las diluciones en series de bazo porcino, preparadas como en el Ejemplo I, 1 por 10.000, 1 por 100.000 y 1 por 1.000.000 tomando cuatro cerdos para cada dilución. Simultáneamente, fué inyectado subcutáneamente cada puercos, en la axila del otro lado con 10 c.c. de suero anticolérico. Se tomó la temperatura rectal de los cerdos cotidianamente, durante veintiun días. Dentro de este periodo, solo un cerdo tratado con la dilución al 1 por 10.000 mostró una elevación de temperatura significativa.

Para permitir que la inmunidad pasiva conferida por el suero tuviera tiempo de disiparse, la resistencia de estos puercos fué puesta a prueba con 2 c.c. de sangre con virus virulento de cólera porcino seis semanas después de la inyección. Tres cerdos inyectados con la dilución al



1 por 1.000.000 sucumbieron después de la prueba. El resto sobrevivió sin síntomas de cólera.

5 Sobre tal base se ha deducido que la dosis inmunizante mínima de virus del cólera porcino propagado en cerdos y atenuado en conejos - cuando se da simultáneamente con 10 c.c. de suero anticolérico- es del orden de 1 c.c. de dilución entre el 1 por 100.000 y el 1 por 1.000.000.

10 Debe advertirse que, aunque en los ejemplos precedentes el método preferido consiste en la inyección del virus y del suero por separado, el suero anticolérico puede ser mezclado con la suspensión del virus atenuado para efectuar la inyección, si así se desea. Cuando se inyectan juntos- suero y virus atenuado - la cantidad de cada uno debe ser elegida de tal modo que el virus no resulte completamente destruído. Se ha hallado que 5 a 15 c.c. aproximadamente de suero anticolérico, si se usa junto con 1 c.c. aproximadamente de virus atenuado- preparado como ya se ha descrito inmuniza satisfactoriamente al puerco contra el cólera de su especie y además le protege esencialmente contra los agentes causantes de infecciones secundarias. Las dosificaciones de virus para inmunizar puercos propagado en cerdos, atenuado en conejos- pueden variar ampliamente. Medio centímetro cúbico de sangre con virus atenuado resulta más que adecuado, mientras que 10 c.c. de sangre con el virus atenuado no parece actuar mejor ni peor que la cantidad más pequeña en lo que se refiere a conferir inmunidad contra el cólera del cerdo. Las vísceras de puerco, tales como el bazo de cerdo la dosis mínima

15

20

25



inmunizante es del orden aproximadamente de 1 c.c. de una dilución del 1 por 100.000 al 1 por 1.000.000. El producto se administra indiferentemente por inyección parenteral o mediante alimentación por vía oral. A lo que parece solo es necesario introducir una cantidad muy pequeña del virus atenuado en el cerdo sensible a la infección. El virus se reproduce por si mismo y estimula una inmunidad activa, presumiblemente, duradera toda la vida.

---- N O T A ----

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

15 1ª. Un procedimiento de preparación de una vacuna para inmunizar puercos contra el cólera porcino, caracterizado por atenuar virus del cólera porcino mediante una transferencia animal en serie, separa virus atenuado de ella,



concentrado el virus atenuado por inyección en el puerco y una vez obtenida la elevación de temperatura- recoger aquellas partes del cerdo que contenga el virus atenuado en forma relativamente concentrada.

5 2º. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por la atenuación del virus del cólera porcino mediante su transmisión a través de una serie de animales relativamente pequeños.

10 3º. Un procedimiento conforme a la reivindicación 2, caracterizados por que los pequeños animales utilizados son conejos.

15 4º. Un procedimiento conforme a las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado por separar tejidos del cerdo relativamente ricos en cuerpos de virus, triturando finamente los citados tejidos para obtener un producto de vacunación conteniendo virus atenuado del cólera porcino en forma relativamente concentrada.

20 5º. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por inyectar virus del cólera porcino a través de una serie de conejos, extrayendo de ellos los tejidos conteniendo virus atenuado del cólera porcino, triturando finamente el citado tejido y preparando con él una suspensión acuosa que contenga entre el 1 al 10% del tejido e inyectando un mínimo de cerca de 1/4 c.c. de la indicada
25 suspensión, en un cerdo y cuando se ha obtenido una elevación de temperatura, extrayendo del cerdo aquellas partes que contengan el virus atenuado a concentración relativamente alta.



6º. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por recoger aquellas partes del cerdo que contienen el virus en el momento en que el virus se encuentra todavía en forma
5 atenuada y no virulenta para el cólera porcino y también en el momento en que la concentración del virus atenuado ha aumentado esencialmente por encima de la concentración en el momento de la inyección, eliminando por tamizado las materias indeseables de la masa de cerdo recogida y obtenien-
10 do una vacuna que contenga substancia de puerco llevando consigo el virus atenuado en una concentración esencialmente más alta que la obtenida después de dicha transferencia en serie a través de animales.

7º. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las precedentes reivindicaciones, caracterizado por
15 atenuar una cepa virulenta de virus de cólera porcino únicamente por transmitirlo a través de una serie de 13 a 14 conejos.

8º. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado por
20 el hecho de que la parte recogida del puerco se elige del grupo formado por la sangre de cerdo, bazo de cerdo y testículos de cerdo.

9º. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, caracterizado por tratar la parte recogida para
25 eliminar fracciones indeseables del grupo, consistente en fibrina y partículas indebidamente grandes, incapaces de



atravesar un tamiz fino, eliminando las citadas fracciones de cerdo indeseables y aislando finalmente una substancia vacunadora contra el cólera porcino de origen porcino, conteniendo virus atenuado de cólera porcino en concentración relativamente alta.

10°. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado por sangrar el cerdo, tratar la sangre de cerdo conteniendo el virus a concentración relativamente alta, para separar de ella la fibrina; esterilizar bacteriológicamente la sangre de cerdo desfibrinada y obtener de ella una vacuna compuesta por sangre de cerdo desfibrinada llevando consigo virus atenuado de cólera porcino a concentración relativamente alta.

11°. Un procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 3, caracterizado por separar sangre y tejidos conteniendo el virus atenuado a concentraciones relativamente altas.

12°. Un procedimiento de inmunizar un puerco contra el cólera porcino, caracterizado por inyectar en el puerco una vacuna contra el cólera porcino, propagada en cerdos, atenuada en conejos, y en inyectar- en esencia, simultáneamente- en el cerdo una substancia preventiva contra infecciones secundarias.

13°. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por el hecho de que la citada substancia inyectada, aproximadamente al mismo tiempo, que la vacuna es suero contra el cólera porcino.

202131



052

14º. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 12, caracterizado por el hecho de que la citada substancia inyectada, aproximadamente al mismo tiempo que la vacuna, es una globulina gamma derivada de la sangre del puerco.

15º. Un procedimiento para preparar una vacuna contra el cólera porcino.

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

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

Madrid

3 MAR. 1952

P. A.

Alberto de Elzabura
Por Poder.