

260630

- 1 -

27 ADE



260630

## MEMORIA DESCRIPTIVA

que se acompaña a la solicitud de una

PATENTE DE INVENCION

por VEINTE años en España, por "PROCESO PARA LA

PREPARACION DE UNA VACUNA"

a favor de

Allen & Hanburys Limited, Entidad británica,

domiciliado en Three Colts Lane - Bethnall Green

LONDON E.2 -Inglaterra.

INVENTOR: Paul Hyman Silverman, de nacionalidad inglesa.

PRIORIDAD: solicitud inglesa 29943/59 del 2.9.59

...



27 ACO

260630

Esta invención se relaciona con vacunas contra enfermedades causadas por nematodos patógenos para los vertebrados.

5 Durante los últimos tres decenios, por lo menos, se ha publicado en la literatura científica un considerable volumen de trabajo sobre la inmunidad contra los helmintos.

10 Este trabajo incluye la investigación de la inmunidad adquirida por medios naturales (es decir la inmunidad que sigue a una infección natural), la de auto-curación y la artificial. Gran parte del trabajo se ha centrado sobre el Haemonchus contortus, la Trichinella spiralis y el Nippostrongylus muris (parásito de es-

15 casa importancia económica). Los materiales usados por inyección en los intentos de producir una inmunidad artificial han sido en gran parte preparaciones de gusanos completamente adultos o extractos fraccionados de los mismos. También se han investigado larvas infecciosas en

tercera fase, sus excreciones y secreciones y extractos de esófago de dichas larvas, no habiéndose conseguido ninguna vacuna satisfactoria con tales investigaciones.

20 Se cree que la única vacuna comercialmente producida contra los nematodos patógenos es la dirigida contra el Dictyocaulus viviperus, producida por el método creado por investigadores de la Universidad de Glasgow mediante irradiación de larvas con una radiación ionizante.

25 La presente invención proporciona una vacuna que contiene antígenos estimuladores de la producción en el huésped de anticuerpos que ofrecen protección, al administrarse por inyección, contra enfermedades causadas por nematodos patógenos para los vertebrados.

30 La producción de esta vacuna ha sido posible mediante el desarrollo de un proceso satisfactorio para el cultivo in vitro



de los parásitos durante sus fases productoras de antígenos.

El trabajo que ha dado lugar a la presente invención indica que existen por lo menos dos antígenos implicados en la producción de inmunidad en los presentes casos, concretamente:

5           1. Antígenos producidos durante el desarrollo de las fases histotróficas de las larvas, es decir excreciones, secreciones y productos metabólicos.

          2. Antígenos somáticos, es decir los contenidos en las larvas.

10           Sin embargo, es preferible que la vacuna incluya también los antígenos producidos durante el desprendimiento de la vaina de las larvas en tercera fase o durante la fase del ciclo vital correspondiente a la penetración de dichas larvas en los tejidos del huésped.

15           La antigenicidad de estos componentes ha sido establecida mediante ensayos de sensibilidad cutánea basados en el fenómeno de que un animal inmune o infectado produce una respuesta eritemática a un antígeno y/o un edema localizado cuando es inyectado intradérmicamente. Este tipo de reacción es mensurable y específico.

20           Como se verá más adelante, en ciertos casos esta antigenicidad ha sido confirmada por estudios sobre inmunidad en animales de laboratorio susceptibles y otros.

25           En el caso de los parásitos que han sido más plenamente investigados, se ha llegado a la conclusión de que un preparado que contenga los productos del metabolismo de la ecdisis del parásito y los antígenos somáticos de las formas histotróficas del mismo, producirá un grado de inmunidad en el huésped natural.

30           En consecuencia, la presente invención proporciona un proceso para la preparación de una vacuna que al administrarse por inyección estimula la protección contra enfermedades causadas por



260530

5 nematodos patógenos para los vertebrados, cuyo proceso comprende el desarrollo de larvas de nematodos infecciosos en tercera fase a las fases histotróficas por incubación en un medio de cultivo acuoso estéril, y el uso del medio que contiene las larvas como vacuna, o el secado de dicho medio de cultivo y las larvas en él contenidas y la suspensión del material secado en un vehículo acuoso estéril para producir una vacuna.

10 Preferiblemente, se añaden las secreciones producidas durante el desprendimiento de la vaina de las larvas en tercera fase o durante la fase del ciclo vital correspondiente a la penetración de aquéllas en los tejidos del huésped, ya sea antes o después del secado del medio de cultivo en que se producen las fases larvarias histotróficas, o en la vacuna terminada.

15 De acuerdo con una versión preferida, el proceso de la presente invención se lleva a cabo como sigue:

20 Se recogen larvas infecciosas en tercera fase de las heces de animales infectados, cuyas heces han sido incubadas bajo condiciones adecuadas para el desarrollo de las larvas en tercera fase. Luego se sumergen las larvas limpiadas en un medio que provoca el desprendimiento de las vainas de las mismas. Cuando se ha producido tal desprendimiento, se separan las larvas de la solución, que se conserva. Luego se suspenden las larvas en un pequeño volumen de una solución acuosa de un agente antimicrobiano adecuado o mezcla de tales agentes para reducir la posibilidad de contaminación bacteriana y otras. Los antibióticos conocidos son adecuados para este fin, por ejemplo la penicilina y estreptomycin. Luego se separan las larvas y se ponen en una solución salina estéril equilibrada que contenga material nutriente que permita su desarrollo a las fases histotróficas. La incubación se lleva a cabo aproximadamente a 37°C, con oxigenación y agitación si es preciso, hasta que las

25

30

260630

27 AGO



muestras de ensayo demuestren el adecuado grado de desarrollo larva-  
rio. Luego se congela el medio de cultivo con sus larvas y se seca,  
mediante secado por congelación. Antes del secado puede añadirse  
la solución que se conservó del proceso de desprendimiento de las  
5 vainas, tratada previamente para separar cualesquiera iones inorgá-  
nicos indeseados. El material antigénico secado así obtenido es suspen-  
dido en un vehículo acuoso estéril antes de su inyección. Con los  
materiales antígenos pueden emplearse adecuados coadyuvantes cono-  
cidos, tales como el hidróxido aluminico.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

Ejemplo 1

Preparación de una vacuna contra el Dictyocaulus viviparus.

Se preparó una suspensión limpia de larvas infecciosas  
en tercera fase del Dictyocaulus viviparus en agua mediante las  
15 heces incubadas de terneras previamente infectadas con el parásico.  
La suspensión fué conservada durante 12 días a 15°C, se centrifugó  
luego durante dos minutos y el líquido sobrenadante fué sustituido  
por solución de pepsina gástrica. La suspensión fué incubada a 37°C  
hasta que los recuentos de comprobación indicaron que más del 90%  
20 de las larvas se habían desprendido de sus vainas. En esta fase se  
volvió a centrifugas la suspensión y se retiró el líquido sobrena-  
dante, se neutralizó con una solución de carbonato sódico, se distri-  
buyó en volúmenes de 2 ml y se congeló. Las larvas desprovistas de  
sus vainas fueron entonces colocadas en una solución conteniendo pe-  
25 nicilina y estreptomocina, 1000 unidades por ml, y nistatina, 250  
unidades por ml, dejándose durante una hora a la temperatura ambien-  
te. Luego se lavaron las larvas con agua estéril y se pasaron a fras-  
cos conteniendo el medio de cultivo, consistente en una solución de  
Tyrodes con adición de extracto de hígado, Siguió la incubación a  
30 37°C hasta que un porcentaje no inferior al 60% de las larvas se hu-

27



260330

bo desarrollado a la cuarta fase. Luego se pasaron el medio de cultivo y las larvas en los volúmenes requeridos a recipientes adecuados y se secaron por congelación. Cuando se requirió su empleo, los antígenos secados por congelación fueron pulverizados y suspendidos en agua estéril, añadiéndose el volumen requerido del medio empleado para el desprendimiento de las vainas.

Ejemplo 2

Preparación de una vacuna contra el *Haemonchus contortus*.

Se preparó una suspensión limpia de larvas infecciosas en tercera fase de *Haemonchus contortus* en agua utilizando las heces incubadas de carneros previamente infectados con el parásito. Esta suspensión fué centrifugada durante dos minutos y el líquido sobrenadante fué separado y sustituido con una solución que contenía un 0,03% de hipoclorito sódico y un 0,5% de cloruro sódico. Se incubó la suspensión a 37°C hasta que los recuentos de comprobación indicaron que más de un 90% de las larvas se habían desprendido de sus vainas. En esta fase se volvió a centrifugar la suspensión y se separó el líquido sobrenadante, dializándose contra agua destilada y distribuyéndose en volúmenes de 2 ml, con ulterior congelación. Las larvas desprovistas de sus vainas fueron colocadas entonces en una solución conteniendo penicilina y estreptomina, 1000 unidades por ml, y nistanina, 250 unidades por ml, dejándose durante una hora a la temperatura ambiente, luego se lavaron las larvas con agua estéril y se pasaron a frascos conteniendo el medio de cultivo consistente en solución de Earle conteniendo los productos de la hidrólisis de hígado y caseína.

Siguió una incubación a 37°C hasta que una proporción no inferior al 60% de las larvas se hubo desarrollado a la cuarta fase. El medio de cultivo y las larvas fueron luego pasados en los volúmenes requeridos a recipientes y secados por congelación. Al requerir-



260630

se su empleo, los antígenos secados por congelación fueron pulverizados y suspendidos en agua estéril, añadiéndose el volumen necesario del medio empleado para el desprendimiento de las vainas.

Ejemplo 3

Preparación de una vacuna contra la *Ostertagia ostertagi*.

5                   Se preparó una suspensión limpia de larvas infecciosas en tercera fase de *Ostertagia ostertagi* en agua empleando las heces incubadas de terneras previamente infectadas con el parásito. Se dejó asentar esta suspensión, se separó el líquido sobrenadante y

10 se sustituyó con una solución de hipoclorito sódico (0,075%) y cloruro sódico (1,5%). Se dejó la suspensión a la temperatura ambiente hasta que los recuentos de comprobación indicaron que más del 90% de las larvas se habían desprendido de sus vainas. En esta fase se centrifugó la suspensión, se separó el líquido sobrenadante, se

15 dializó contra agua destilada, se distribuyó en volúmenes convenientes y se congeló. Las larvas desprovistas de sus vainas fueron lavadas con agua estéril, centrifugadas y colocadas en una solución que contenía penicilina y estreptomycin, 1000 unidades por ml, y nistatina, 250 unidades por ml, dejándose durante una hora a la tem-

20 peratura ambiente. Luego se lavaron las larvas de nuevo con agua estéril y se pasaron a frascos que contenían el medio de cultivo consistente en solución de Earle conteniendo productos de la hidrólisis de hígado. Los frascos de cultivo fueron luego incubados a 37°C en una máquina oscilante hasta que una proporción no inferior al 60%

25 de las larvas se hubo desarrollado a la cuarta fase. El medio de cultivo y las larvas fueron luego pasados en los volúmenes requeridos a recipientes y se secaron por congelación. Cuando se necesitaron para su empleo, los antígenos secados por congelación fueron pulverizados y suspendidos en agua estéril, añadiéndose el volumen requerido del líquido empleado en el desprendimiento de las vainas.

30

260630



Ejemplo 4

Preparación de una vacuna contra el Strongylus vulgaris.

Se preparó una suspensión limpia de larvas infecciosas en tercera fase de Strongylus vulgaris en agua utilizando las heces incubadas de caballos previamente infectados con este parásito.

Se dejó asentar esta suspensión, se separó el líquido sobrenadante y se substituyó con una solución de hipoclorito sódico (0,075%) y cloruro sódico (1,5%). Se dejó la suspensión a la temperatura ambiente hasta que los recuentos de comprobación indicaron que más del 90% de las larvas se habían desprendido de sus vainas.

En esta fase se centrifugó la suspensión, se separó el líquido sobrenadante y se dializó contra agua destilada, se distribuyó en volúmenes convenientes y se congeló. Las larvas desprovistas de sus vainas fueron lavadas con agua estéril, centrifugadas y puestas en una solución que contenía penicilina y estreptomicina, 1000 unidades por ml, y nistatina, 250 unidades por ml, dejándose durante una hora a la temperatura ambiente. Luego se lavaron de nuevo las larvas con agua estéril y se pasaron a frascos que contenían el medio de cultivo consistente en solución de Earle conteniendo productos de la hidrólisis de hígado.

Los frascos de cultivo fueron luego incubados a 37°C en una máquina de tubo rodante hasta que una proporción no inferior al 60% de las larvas se hubo desarrollado a la cuarta fase. El medio de cultivo y las larvas fueron entonces pasados en los volúmenes requeridos a recipientes y secados por congelación. Al requerirse para su empleo, los antígenos secados por congelación fueron pulverizados y suspendidos en agua estéril y se añadió el volumen necesario de líquido empleado en el desprendimiento de las vainas.



Ejemplo 5

Preparación de una vacuna contra el Trichostrongylus axei.

5 Se preparó una suspensión limpia de larvas infecciosas en tercera fase de Trichostrongylus axei en agua empleando heces incubadas de carneros previamente infectados con el parásito. Se dejó asentar esta suspensión, se separó el líquido sobrenadante y se substituyó con una solución que contenía hipoclorito sódico (0,075%) y cloruro sódico (1,5%). Se dejó la suspensión a la temperatura ambiente hasta que los recuentos de comprobación indicaron  
10 que más del 90% de las larvas se habían desprendido de sus vainas.

En esta fase se centrifugó la suspensión, se separó el líquido sobrenadante, se dializó contra agua destilada, se distribuyó en volúmenes convenientemente y se congeló. Las larvas desprovistas de sus vainas fueron lavadas con agua estéril, centrifugadas y puestas en una solución que contenía penicilina y estreptomina,  
15 cina, 1000 unidades por ml, y nistatina, 250 unidades por ml, dejándose durante una hora a la temperatura ambiente. Luego se lavaron las larvas de nuevo con agua estéril y se pasaron a frascos conteniendo el medio de cultivo, consistente en solución No. 199  
20 para cultivo de tejidos.

Los frascos de cultivo fueron luego incubados a 37°C en una máquina oscilante hasta que una proporción no inferior al 60% de las larvas se hubieron desarrollado a la cuarta fase. Entonces se pasaron el medio de cultivo y las larvas en los volúmenes re-  
25 queridos a recipientes y se secaron por congelación. Al ser requeridos para su empleo, los antígenos secados por congelación fueron pulverizados y suspendidos en agua estéril y se añadió el volumen necesario del líquido empleado en el desprendimiento de las vainas.

Ejemplo 6

Preparación de una vacuna contra el Strongyloides papillosus.



27330

5 Se preparó una suspensión limpia de larvas infecciosas en tercera fase de Strongyloides papillosus en agua empleando heces incubadas de carneros previamente infectados con el parásito. Se dejó asentar esta suspensión, se separó el líquido sobrenadante y se colocaron las larvas en una solución que contenía penicilina y estreptomocina, 1000 unidades por ml, y nistatina, 250 unidades por ml, dejándose durante una hora a la temperatura ambiente. Luego se centrifugó la suspensión, se lavaron las larvas con agua estéril y se pasaron a frascos de cultivo que contenían el medio de cultivo consisten-  
10 tes en solución de Tyrode modificada por omisión de glucosa, con productos de la hidrólisis de hígado.

15 Los frascos fueron luego incubados a 37°C en una máquina oscilante hasta que una proporción no inferior al 60% de las larvas se hubo desarrollado a la cuarta fase. El medio de cultivo y las larvas fueron luego pasados en los volúmenes necesarios a recipientes y se secaron por congelación. Al requerirse su empleo, los antígenos secados por congelación fueron pulverizados y suspendidos en agua estéril.

#### Ejemplo 7

#### Preparación de una vacuna contra la Ostertagia circumcincta.

20 Se preparó una suspensión limpia de larvas infecciosas en tercera fase de Ostertagia circumcincta en agua empleando heces incubadas de carneros previamente infectados con el parásito. Se dejó asentar esta suspensión, se separó el líquido sobrenadante y se sustituyó por una solución que contenía hipoclorito sódico (0,075%) y cloruro sódico (1,5%). Se dejó la suspensión a la temperatura ambiente hasta que los recuentos de comprobación indicaron que más del 90% de las larvas se habían desprendido de sus vainas.  
25

30 En esta fase fué centrifugada la suspensión, se separó

27 AGO

280830



5 el líquido sobrenadante y se dializó contra agua destilada, distribuyéndose en volúmenes convenientes y seguidamente se congeló. Las larvas desprovistas de sus vainas fueron lavadas con agua estéril, centrifugadas y colocadas en una solución que contenía penicilina y estreptomina, 1000 unidades por ml, y nistatina, 250 unidades por ml, dejándose durante una hora a la temperatura ambiente. Luego se lavaron las larvas de nuevo con agua estéril y se pasaron a frascos conteniendo el medio de cultivo, consistente en solución de Earl con productos de la hidrólisis de hígado.

10 Los frascos de cultivo fueron luego incubados a 37°C en una máquina de tubo rodante hasta que una proporción no inferior a 60% de las larvas se hubo desarrollado a la cuarta fase. El medio de cultivo y las larvas fueron luego pasados en los volúmenes necesarios a recipientes, donde se secaron por congelación. Al requerirse su empleo, los antígenos secados por congelación fueron suspendidos en la adición de agua estéril y se agregó la cantidad requerida del líquido empleado para el desprendimiento de las vainas.

#### Ejemplo 8

#### Preparación de una vacuna contra el *Trichostrongylus colubriformis*.

20 Se preparó una suspensión limpia de larvas infecciosas en tercera fase de *Trichostrongylus colubriformis* en agua empleando heces incubadas de carneros previamente infectados con el parásito, Se dejó asentar ésta suspensión, se separó el líquido sobrenadante y se substituyó por una solución que contenía hipoclorito sódico - 25 (0,075%) y cloruro sódico (1,5%). Se dejó la suspensión a la temperatura ambiente hasta que los recuentos de comprobación indicaron que más del 90% de las larvas se habían desprendido de sus vainas.

30 En esta fase se centrifugó la suspensión, se separó el líquido sobrenadante, se dializó contra agua destilada, se distri-

260630



5      buyó en volúmenes convenientes y se congeló. Las larvas desprovistas de sus vainas fueron lavadas con agua estéril, centrifugadas y colocadas en una solución que contenía penicilina y estreptomicina, 1000 unidades por ml, y nistatina, 250 unidades por ml, dejándose durante una hora a la temperatura ambiente. Las larvas fueron luego lavadas de nuevo con agua estéril y pasadas a frascos que contenían el medio de cultivo, consistente en solución de Hank con productos de la hidrólisis de hígado.

10      Los frascos de cultivo fueron luego incubados a 37°C en una máquina oscilante hasta que una proporción no inferior al 60% de las larvas se hubo desarrollado a la cuarta fase. El medio de cultivo y las larvas fueron luego pasados en los volúmenes necesarios a recipientes, donde se secaron por congelación.

15      Al requerirse su empleo, los antígenos secados por congelación fueron pulverizados y suspendidos en agua destilada estéril y se agregó la cantidad requerida de líquido empleado en el desprendimiento de las vainas.

20      Terneras que habían sido naturalmente infectadas con Dictyocaulus viviparus u Ostertagia ostertagi, carneros que lo habían sido igualmente con Haemonchus contortus, Strongyloides papillosus, Trichostrongylus colubriformis o Trichostrongylus axei y caballos que también fueron infectados por vía natural con Strongylus vulgaris, fueron sometidos a ensayos de sensibilidad controlada mediante la inyección intradérmica de la vacuna adecuada. En todos  
25      los casos se produjo una reacción típica positiva de abultamientos y ronchas en los animales infectados, en tanto que en los animales de control, no infectados, no se produjo ninguna de tales reacciones. Estos experimentos mostraron que los antígenos contenidos en las  
30      diversas vacunas eran homólogos a los producidos en las diversas vacunas eran homólogos a los producidos en las diversas infecciones.

20000



La vacuna preparada de acuerdo con el ejemplo 1 fué ensayada como sigue:

5 A. Se aplicaron a un grupo de cerdos de guinea dos inyecciones intraperitoneales de la vacuna con un intervalo de 21 días entre ellas. Cada inyección era el equivalente de 3000 a 5000 larvas de Dictyocaulus viviparus. Diez días después de la segunda inyección los cerdos vacunados y un grupo similar de ellos sin tratar fueron expuestos con 5000 larvas infecciosas normales por vía oral. Nueve días después de esta exposición fueron matados todos  
10 ellos y examinados sus pulmones. Los cerdos de guinea vacunados mostraron una protección del 90% en comparación con el grupo de control.

B. Se aplicaron cuatro inyecciones intradérmicas a cada ternera de un grupo de cinco, con intervalos de una semana. Cada inyección era el equivalente de unas 5000 larvas de Dictyocaulus viviparus. Tres semanas después de la última inyección se expusieron  
15 aquellas terneras y otras cinco más como controles sin tratar con 4000 larvas infecciosas normales. Diariamente se efectuaron observaciones clínicas, incluyendo el tipo y ritmo de la respiración y exámenes de las heces. Treinta días después de la exposición fueron  
20 matados todos los animales y examinados sus pulmones para determinar posibles lesiones patológicas.

Los ritmos respiratorios de los animales de control se duplicaron sobradamente después de la exposición y mostraron síntomas clínicos típicos de bronquitis parasítica causada por Dictyocaulus viviparus. En la necropsia, sus pulmones mostraron grandes zonas de colapso y endurecimiento.  
25

En contraste, los animales vacunados sólo mostraron un ligero aumento en el ritmo respiratorio y en su necropsia se observó que el daño producido en sus pulmones fué considerablemente inferior al observado en los animales de control.  
30



266630

5 La vacuna preparada de acuerdo con el ejemplo 2 fué  
ensayada con corderos. Se aplicó a cada uno de ellos, de un grupo  
de cinco, un total de dos inyecciones subcutáneas de la vacuna con  
un intervalo de 21 días entre las inyecciones. Cada una de éstas  
era el equivalente de 5000 larvas aproximadamente de Haemonchus  
10 contortus. Diez días después de la segunda inyección se expuso a  
los corderos, junto con otros cinco más no tratados, con 5000 lar-  
vas infecciosas. Se efectuaron semanalmente mediciones de los va-  
lores sanguíneos durante cuatro semanas después de aquella exposi-  
ción. Al cabo de este período se mataron todos los animales y se  
contaron los gusanos contenidos en el abomaso de cada uno de  
ellos. Los animales de control sufrían una severa anemia, hallándo-  
se reducidos aproximadamente a la mitad de los valores originales  
el número de células sanguíneas rojas, el volumen de células agru-  
15 padas y el nivel hemoglobínico, en tanto que los animales vacunados  
mostraron reducciones muy inferiores en esos valores. El número me-  
dio de gusanos hallados en los animales de control fué triple al  
de los animales vacunados.

20 La vacuna preparada de acuerdo con el ejemplo 4 fué  
ensayada en potros como sigue:

Se aplicaron dos inyecciones subcutáneas de la vacuna  
a cada uno de un grupo de ocho potros con un intervalo de 21 días  
y otra inyección intradérmica tres meses más tarde. Cada inyección  
fué aproximadamente el equivalente de 9000 larvas de Strongylus  
25 vulgaris. Estos animales vacunados y otros seis más no tratados y  
usados como controles estuvieron pastando en un prado infectado  
con Strongylus vulgaris. Cinco meses después fueron matados y se  
realizaron exámenes en sus cadáveres.

30 El Strongylus vulgaris penetra en el sistema arterial  
del caballo, donde produce arteritis, juzgándose mejor su efecto



260630

sobre el animal mediante un examen de la patología arterial producida.

En los animales hasta ahora matados en este ensayo se ha observado que en el control existía un verdadero aneurisma aórtico, en tanto que en el animal vacunado no se observó esta lesión.

La vacuna preparada de acuerdo con el ejemplo 6 fué ensayada como sigue:

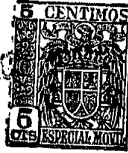
Se aplicaron dos inyecciones intraperitoneales a cada uno de un grupo de cinco conejos con un intervalo de 21 días entre ambas inyecciones. Cada una de éstas equivalía aproximadamente a 3000 larvas de Strongyloides papillosus. Cuatro meses después de la segunda inyección se expusieron los cinco conejos y un número igual de controles sin tratar mediante la aplicación de 150.000 larvas filariformes infecciosas a la piel. Diez días después de la exposición fueron matados los conejos y examinada la presencia de parásitos en sus intestinos delgados.

En el grupo de control se habían establecido 112.411 parásitos, mientras que en el grupo vacunado el total fué sólo de 5.528. El grado de protección en los animales vacunados en este experimento fué del 95%.

La vacuna preparada de acuerdo con el ejemplo 8 fué ensayada como sigue:

Se aplicaron dos inyecciones de la vacuna por vía intraperitoneal a cada uno de un grupo de ocho cerdos de guinea, con un intervalo de 21 días entre ambas inyecciones, La dosis de la vacuna administrada osciló entre el equivalente aproximado de 250 a 2000 larvas de Trichostrongylus colubriformis. Diez días después de la segunda inyección se expusieron los animales de ensayo y los de control a la acción de 5000 larvas infecciosas. Los animales fueron sacrificados 8 días después de aquella exposición. En la necrop-

27 10



200530

sia de los mismos, el promedio de gusanos recuperados de los animales de control fué de 2035, mientras que este promedio fué sólo de 179 en los animales vacunados. El grado de protección proporcionado por la vacuna en este experimento fué, por consiguiente, superior al 90%.

REIVINDICACIONES

En resumen: la Patente de invención cuyo registro se solicita recaerá sobre las reivindicaciones siguientes:

1. Proceso para la preparación de una vacuna que, administrada por inyección, estimula la protección contra enfermedades causadas por nematodos patógenos para los vertebrados, cuyo proceso se caracteriza porque se estimula el desarrollo de larvas de nematodos infecciosos en tercera fase a las fases histotróficas mediante incubación en un medio de cultivo acuoso estéril y porque el medio que contiene las larvas se usa como vacuna, o el citado medio de cultivo y las larvas en él contenidas son secados y el material secado es suspendido en un vehículo acuoso estéril para producir una vacuna.

2. Proceso según la reivindicación 1, caracterizado porque las secreciones producidas durante el desprendimiento de las vainas de larvas en tercera fase o durante la fase del ciclo vital correspondiente a la penetración en los tejidos del huésped son añadidas antes o después del secado del medio de cultivo en que se producen las fases larvarias histotróficas, o bien se añaden a la vacuna terminada.

3. Proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque las larvas de nematodo son larvas de Dictyocaulus viviparus.

4. Proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque las larvas de nematodo son larvas de Haemonchus contortus.



260630

5. Proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque las larvas de nematodo son larvas de Ostertagia ostertagi.

5 6. Proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque las larvas de nematodo son larvas de Strongylus vulgaris.

7. Proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque las larvas de nematodo son larvas de Trichostrongylus axei.

10 8. Proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque las larvas de nematodo son larvas de Strongyloides papillosus.

9. Proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizado porque las larvas de nematodo son larvas de Ostertagia circumcincta.

15 10. Proceso según las reivindicaciones 1 ó 2, caracterizada porque las larvas de nematodo son larvas de Trichostrongylus colubriformis.

11. Se reivindica por último, como objeto sobre el que ha de recaer la Patente de invención que se solicita: "PROCESO PARA LA PREPARACION DE UNA VACUNA".

20 Todo conforme queda descrito en la presente memoria que consta de diecisiete páginas mecanografiadas.

Madrid, 27 de agosto de 1960

ALFONSO UNGRIA