

301232



301232

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

a favor de:

BEHRINGWERKE AKTIENGESELLSCHAFT, de nacionalidad alemana, residente en Marburg/Lahn (República Federal Alemana), por:
"PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA VACUNA CONTRA LA GLOSOPEDA".

- - - - -

Memoria descriptiva

Constituye el objeto de la invención un procedimiento para la obtención de una vacuna contra la glosopeda.

Se conocen ya procedimientos para la producción de vacunas con virus inactivados de glosopeda según los cuales se
5 multiplica virus de glosopeda sobre la mucosa de la lengua de reses vacunas vivas (procedimiento Waldmann, Zbl. Bakt. Orig. 148, 1, 1941), o in vitro, sobre mucosa aislada de la lengua de reses vacunas (procedimiento Frenkel, Bull. Off. int. Epiz. 28, 155, 1947 y 39, 91, 1953). Las vacunas así obtenidas son



301232

1500/1061

10 adecuadas para inmunizar contra la glosopeda ganado vacuno,
ovejas y cabras, pero no proporcionan protección segura a los
cerdos, aun cuando se multiplique la dosis (Vet. Med. Nachr.
1960, (2), 1, Blaue Hefte 1961, (3), 483). Hasta ahora, no se
conoce procedimiento alguno para la obtención de una vacuna
15 contra la glosopeda que proporcione una inmunización segura
de los cerdos.

El cultivo del virus de glosopeda natural sobre la mu-
cosa de la lengua de reses vacunas vivas (procedimiento Wald-
mann) supone la reunión de un gran número de reses vacunas
20 predispuestas a la glosopeda. La obtención de virus de glo-
sopeda por el procedimiento de Frenkel tropieza con notables
dificultades debido a la necesidad de una preparación conti-
nua de cantidades suficientes de mucosas aisladas de la len-
gua de reses vacunas recién sacrificadas. También se ha tra-
25 tado ya de cultivar el virus de glosopeda en cultivos de te-
jidos. Sin embargo, no se ha conseguido obtener mediante cul-
tivos de tejidos una vacuna, utilizable contra la glosopeda,
que produjese una inmunidad activa durante un tiempo prolon-
gado. En efecto, todos los ensayos hasta aquí realizados en
30 esta dirección han revelado que las vacunas inactivadas de
cultivos de tejidos son ya inferiores en la inmunización de
reses vacunas, ovejas y cabras, a las vacunas obtenidas por
los procedimientos de Waldmann y Frenkel y no satisfacen los
requisitos de la práctica.

35 También se ha tratado ya sustituir con otras sustancias
el gel de hidróxido de aluminio, que sirve corrientemente de
coadyuvante, o de combinar el hidróxido de aluminio con sapo-
nina, como por ejemplo en las vacunas de virus de Frenkel.
Sin embargo, tales ensayos no han conseguido aumentar nota-
40 blemente la capacidad de inmunización de los virus de glosopeda.



301232

peda y particularmente no han conducido a la obtención de vacuna utilizable alguna para la inmunización del cerdo.

Ahora bien, se ha comprobado que puede obtenerse una vacuna contra la glosopeda que proporciona también una in-
45 munización de cerdos adicionando una suspensión de virus de glosopeda, obtenida en cultivos de tejidos de órganos de animales de pezuña, y especialmente de ríñones de terneros, con saponina en una concentración de 0,1 a 3,5% y preferiblemente de 0,75%, absorbiendo los virus de glosopeda sobre un me-
50 dio de absorción, preferiblemente hidróxido de aluminio tamponado, e inactivándolos de manera en sí conocida.

Como virus de glosopeda con los cuales puede aplicarse el procedimiento de la invención son de considerar, por ejemplo, los tipos de virus europeos y sudamericanos O,A y
55 C (los subtipos se indican con cifras arábigas). El virus empleado en el Ejemplo 1 era del tipo O y del subtipo 2. Otra diferenciación es la que resulta de la subdivisión en razas, cuya denominación se refiere en general al nombre de la localidad o del País en el cual la raza ha sido aislada
60 por primera vez. También los tipos africanos y asiáticos son adecuados para el procedimiento de la invención.

Según la invención, los virus de glosopeda que se emplean son criados convenientemente de la siguiente manera: un virus natural de glosopeda obtenido de manera conocida,
65 por ejemplo por extracción de aftas de lengua de reses vacunas, machacadas en mortero (una afta es una ampolla, que contiene virus de glosopeda, provocada por una infección por virus de glosopeda), es inoculado con una elevada dosis de virus, es decir 10^8 a 10^{10} DL₅₀-ratón, en cultivos de tejidos



301232

70 de órganos de animales de pezuña (una DL_{50} es la dosis de infección que mata un 50% de ratones de 5 - 7 días. Los pasajes siguientes son realizados con cantidades de inoculación fuertemente reducidas. En el tercer pasaje, se ha alcanzado en general la adaptación, expresada por una elevada capacidad
75 dad citopatógena y un elevado título de virus. Si un ensayo preliminar demostrara que la adaptación era todavía incompleta en el 3^{er} pasaje, podría realizarse el 2^o pasaje a modo de llamado pasaje de placa, es decir que el cultivo de tejido, después de eliminarse el virus no susceptible de absorción,
80 es cubierto con un medio alimenticio que contiene metilcelulosa. De las placas que se forman después de 18 - 72 horas (entendiéndose por placa los focos de destrucción celular en el cultivo de tejido provocados por la multiplicación local de partículas citopatógenas de virus), se aísla mediante un
85 tubo capilar una placa y se emplea para la infección del 3^{er} pasaje de cultivo de tejido. Con esta medida, con la cual se seleccionan virus totalmente citopatógenos, se consigue la adaptación al cultivo de tejido ya en el 3^{er} pasaje, incluso con rasas de virus menos propensas a la adaptación.

90 Para la obtención de cultivos de tejidos se emplean órganos de animales de pezuña, por ejemplo riñones, testículos u ovarios de reses vacunas, ovejas, cabras o cerdos. Los cultivos de tejidos son obtenidos por digestión con tripsina de los órganos desmenuzados y cultivo sobre el fondo de los recipientes de cultivo de las células individuales así obtenidas.
95

Convenientemente, para la obtención de las vacunas de glosopeda se procede inoculando los cultivos de tejidos con pequeños volúmenes (0,05 a 0,2 ml) de la parte superyacente que contiene virus de glosopeda del primer pasaje prácticamen-



301232

100 te adaptado por completo, y empleando como medio de desarrollo del virus una solución de sal con contenido fisiológico de electrólito, por ejemplo solución de Hanks o de Earle (véase Handbuch der Virusforschung, tomo 4 (1958), página 212). Los cultivos son incubados durante 24 horas a 37°C. Luego se reco-

105 ge la parte superyacente que contiene virus y se emplea como virus de siembra para la obtención de la vacuna. Este virus de siembra es colocado para su multiplicación en los cultivos de tejidos anteriormente mencionados. Las partes superyacentes son adicionadas con 0,1 a 2,5%, y preferiblemente 0,75% de saponi-

110 na. La saponina es añadida convenientemente diluída en agua al 10%. A continuación se le añade a la suspensión de virus un medio de absorción. Para ello, pueden emplearse ventajosamente hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio, regulados con tampón de glucocola sobre un valor p_H de 8,1 a 8,3. La sus-

115 pensión de virus así obtenida es inactivada de manera en sí conocida, por ejemplo durante 20 a 60 horas, y preferiblemen- te 36 horas, a 10 a 37°C, y preferiblemente a 26°C, por ejem- plo con formaldehído. La vacuna obtenida según la invención ofrece la ventaja de que las cantidades de virus necesarias

120 para una producción en gran escala pueden obtenerse de sencilla manera en laboratorio con medios mínimos de trabajo y de gastos por cultivo de tejidos. La ventaja especial de la vacuna obtenida según la invención consiste en que, con ella, pueden inmunizarse contra la glosopeda no sólo reses vacunas,

125 ovejas y cabras sino también cerdos. Como, desde hace años, la glosopeda se presenta en forma endémica también en el cerdo, la vacuna obtenida según la invención tiene gran importancia. La eficacia de la vacuna contra la glosopeda según la presente invención, en el cerdo, no era de esperar en vista de

130 los resultados no satisfactorios en este sentido del empleo de



301232

hidróxido de aluminio en combinación con saponina en el procedimiento de Frenkel.

Ejemplo 1

135 Se adicionan 400 ml del 4º pasaje de cultivo de tejido
de riñones de ternero de la raza de glosopeda O₂ Normandía,
de un contenido de virus de $10^{7,1}$ TCID₅₀/ml (TCID₅₀ = Tissue
Culture ID₅₀), con 30 ml de una solución acuosa de saponina al
10%, 400 ml de una suspensión de hidróxido de aluminio al 2%,
cuyo p_H se ha regulado sobre 8,3 con tampón de glicocola, con
140 160 ml m/15 de tampón de fosfato y 10 ml de una solución acuosa
de formaldehído, de modo que la concentración final del
formaldehído en la vacuna es del 0,085%, y se mantiene durante
31 horas a 25°C. La vacuna así obtenida es estéril e inofensiva
tanto para la res vacuna como para el ratón de 5 y 7
145 días.

La vacuna de glosopeda inactivada, obtenida de este modo,
ha sido inyectada por vía subcutánea a seis reses vacunas
jóvenes de 1 1/2 años en una dosis de 5,0 ml. A los 17 y 90
días post vaccinationem (p.v.) se infectaron 3 reses vacunas
150 de ensayo y 1 res de control no tratada previamente, cada una
con 50 ml de un extracto homólogo de virus natural de res vacuna
al 2%, por el método del trapo de lana (frotación del
virus infeccioso en la mucosa de la lengua mediante un trapo
de lana).

155 Como resulta de la Tabla siguiente, las reses tratadas
previamente con la vacuna obtenida según la invención fueron
inmunes a la infección de carga, mientras que las reses de
control enfermaron de manera general.



301232

160	Res vacuna nº	Dosis de inoculación. Modo de inoculación	Virus de infección. Modo de infección	Infección de ensayo después de ... días p.v.	Resultado de la Infección de ensayo
165	2860 2861 2864	5,0 ml subcutánea	O ₂ - Normandía método del trapo de lana.	17	} Inmunes
170	2846	Control de infección		-	Enfermó de manera general
	2867 2868 2869	5,0 ml subcutánea		90	} Inmunes
175	2934	Control de infección		-	Enfermó de manera general

180 La obtención de la suspensión de virus empleada según el ejemplo anterior se realizó de la siguiente manera. 30 ml de una suspensión de virus natural de glosopeda de res vacuna del tipo 0, subtipo 2, raza Normandía, obtenida por extracción de 3 g de aftas de lengua de res vacuna machacadas en mortero y
 185 de un contenido de virus de $10^{7,1}$ DL₅₀-ratón/0,1 ml, son aplicados a un cultivo tejido de riñones de ternero de una superficie de aproximadamente 300 cm². Después de un tiempo de adsorción de virus de 30 minutos, se elimina la parte superyacente, se cubre el cultivo infectado con 50 ml de solución de



301232

190 Earle de un p_H 7,3, y se incubaba durante 24 horas a 37°C. El medio de cultivo que contiene virus así obtenido es recogido y aplicado sin diluir y en diluciones decimales progresivas a cultivos de tejido de riñones de ternero de igual tamaño en una cantidad de 10 ml por cultivo de tejido. Después de una du-
195 ración de adsorción de 30 minutos, se elimina la solución superyacente con los virus no adsorbidos y se cubre la alfombra de células con 30 ml del medio de virus anterior que contiene un 0,75% de metilcelulosa y rojo neutro en una concentración de 1:20 000. A las 48 horas, se introduce en el cultivo de te-
200 jido que contiene menos placas y en el centro de una placa un tubo capilar y se aíslan 0,2 ml del medio que se encuentra sobre la placa. Esta muestra, que contiene partículas de virus completamente citopatógenas, es aplicada sobre un cultivo de tejido de riñones de ternero de igual tamaño e incubada a con-
205 tinuación, durante 24 horas, a 37°C. La parte superyacente de este pasaje posee un título de $10^{7,3}$ TCID₅₀/ml. Se aplican sobre otros 3 cultivos de tejido análogos cada vez 0,05 ml de esta parte superyacente, cubiertos cada uno con 50 ml de solución de Earle. La parte superyacente obtenida después de una incu-
210 bación de 24 horas es empleada como material inicial para el ejemplo anterior.

Ejemplo 2

Una vacuna obtenida como en el Ejemplo 1, sólo que con la raza de glosopeda A₅ Hannover (contenido de virus $10^{6,5}$
215 TCID₅₀/ml/ fué inyectada por vía subcutánea tres veces a 3 reses vacunas jóvenes de 1 1/2 años en una dosis de 5,0 ml. La infección de carga fué realizada después de 17, 90 y 180 días.

Como se ve por la Tabla siguiente, las reses inmunizadas eran inmunes tanto después de 17 como después de 90 y 180 días,

301232



220 mientras que las reses de control, aquí también, habían enfer-
mado de manera general.

Res vacuna nº	Dosis de inoculación Modo de inoculación	Virus de infección. Modo de infección	Infección de ensayo después de ...días p.v.	Resultado de la infección de ensayo
225				
2768 2769 2772	5,0 ml subcutánea	A ₅ - Hannover método del <u>tra</u> po de lana.	17	} Inmunes
230	Control de infección		-	Enfermó de manera general
235	5,0 ml subcutánea		90	} Inmunes
240	Control de infección		-	Enfermó de manera general
245	5,0 ml subcutánea		180	} Inmunes
2804	Control de infección		-	Enfermó de manera general
250				

Ejemplo 3

400 ml del 4º pasaje de cultivo de tejido de riñón de ternero de la raza C-Tölz de glosopeda, de un contenido de virus de $10^{7,7}$ TCID₅₀/ml son adicionados con 30 ml de una solución acuosa de saponina al 10%, con 400 ml de una suspensión de hidróxido de aluminio al 2%, cuyo p_H ha sido regulado con tampón

301232



de glicocola sobre 8,3 con 160 ml de tampón de fosfato m/15
y 10 ml de una solución acuosa de formaldehido, de modo que
la concentración final de formaldehido en la vacuna es del
260 0,085%, manteniéndose entonces la masa durante 31 horas a 25°C.
La vacuna así obtenida fué inyectada a 3 reses vacunas jóvenes
de 1 1/2 años y a 8 cerdos de 3 meses en una dosis de 5,0 ml.
Además, se vacunaron con esta vacuna 8 cerdos de 3 meses, con
una dosis de 3,0 ml. A los 17 días, las 3 reses vacunas de en-
265 sayo sometidas a tratamiento preliminar y 1 res vacuna de con-
trol no sometida a tratamiento preliminar fueron infectadas
a título de ensayo por el método del trapo de lana. El 17º
día, los cerdos inoculados fueron reunidos con 7 cerdos no tra-
tados previamente y 7 cerdos infectados por el método del tra-
270 po de lana.

Como muestra la Tabla siguiente (Tabla A), las reses va-
cunas inoculadas con la vacuna obtenida según la invención
quedaron protegidas contra el ataque de la glosopeda, contra-
riamente al animal testigo sin inocular. Por la Tabla B, pue-
275 de verse que los cerdos infectados, y poco después también los
animales de control sin tratar previamente, enfermaron por con-
tacto, mientras que los cerdos que se encontraban igualmente
en contacto con el virus de infección, inmunizados con 3 ml y
con 5 ml de la vacuna obtenida según la invención, quedaron sa-
280 nos.



304222

TABLA A

Res vacuna nº	Dosis de in- oculación, Modo de in- oculación	Virus de infec- ción. Modo de infección	Infección de ensayo a los ... días p.v.	Resultado de la in- fección de ensayo
285 2744 2801 2815	5,0 ml subcutánea	C - Tölz Método del tra- po de lana	17	} Inmunes
290 2797	Control de infección		-	



301222

TABLA B

295	Cerdo nº	Dosis de vacunación. Modo de vacunación	Virus de infección. Modo de infección	Infección de ensayo a los... días p.v.	Resultado de la infección de ensayo	
300	2883 2884 2885 2887	5,0 ml subcutánea	Infección por contacto	17	Inmunes	
305	2917 2918 2919 2921					
310	2913 2914 2915 2916					3,0 ml subcutánea
315	2927 2928 2930 2931					
320	2888 2892 2898 2902 2920 2924	Infección por contacto	-	Enferma- ron de manera general		
325	2925					
330	2886 2889 2890 2891 2922 2923 2926	Controles de infección	C - Tölz Método del trapo de lana			
335						



301232

La suspensión de virus empleada según el Ejemplo anterior
fué obtenida de la siguiente manera. 30 ml de una suspensión de
virus natural de glosopeda de res vacuna, del tipo C, raza Tölz,
obtenida por extracción de 3 g de aftas de lengua de res vacuna
340 machacadas en mortero y que tenía un contenido de virus de
 $10^{6,8}$ DI_{50} -ratón/0,1 ml, son aplicados a un cultivo de tejido
de riñón de ternero de una superficie de aprox. 300 cm². Des-
pués de un tiempo de absorción de virus de 30 minutos, se elimi-
na la parte superyacente y a continuación se cubre el cultivo
345 infectado con 50 ml de solución de Earle como medio de culti-
vo del virus y se incuba durante 24 horas a 37°C. El medio de
cultivo que contiene virus así obtenido es recogido e inoculado
en una cantidad de 1 ml a un cultivo de riñón de ternero de
igual superficie. Después de otras 24 horas de incubación, se
350 infecta con la parte superyacente del 2º pasaje, obtenida de
este modo, otro cultivo de igual superficie con 0,1 ml de la
parte superyacente de cultivo que contiene virus de glosopeda.
La suspensión de virus obtenida después de una nueva incubación
de 24 horas (3º pasaje) sirve para la obtención de la vacuna.
355 Para ello, se aplican cada vez 0,05 ml de la parte superyacen-
te a otros 8 cultivos análogos de tejido, cada uno cubierto por
50 ml de solución de Earle. La parte superyacente obtenida des-
pués de 24 horas de incubación es empleada como material inicial
para el Ejemplo anterior.

360 - Ejemplo 4

Se reúnen 200 ml de una suspensión de virus de glosopeda
de la raza A₅- Hannover (contenido de virus $10^{6,5}$ TCID₅₀/ml),
200 ml de una suspensión de virus de glosopeda de la raza
C - Tölz (contenido de virus $10^{7,7}$ TCID₅₀/ml) - (obtenidos



301232

365 ambos como se describe en el Ejemplo 2 y respectivamente 3)
 30 ml de una solución de saponina al 10%, 400 ml de un hi-
 dróxido de aluminio al 2%, 160 ml de tampón de fosfato m/15
 (p_H 7,6) y 10 ml de una solución de formaldehído al 3% y se
 mantienen durante 31 horas a 25°C. Esta suspensión represen-
 370 ta una vacuna de glosopeda bivalente de los tipos A y C.

La vacuna obtenida de este modo fué aplicada por vía
 subcutánea a 6 reses vacunas en una dosis de 10,0 ml cada una.
 A los 90 días, cada 3 reses vacunas fueron infectadas por el
 método del trapo de lana con virus de glosopeda A₅-Hannover
 375 y respectivamente C -Tölz.

Como permite ver la Tabla siguiente, las reses inmuni-
 zadas estuvieron protegidas contra el ataque de la glosopeda,
 contrariamente a los animales de control.

380	Res vacuna nº	Dosis de inoculación Modo de in- oculación	Virus de infec- ción. Modo de infección	Infección de ensayo a los.... días p.v.	Resultado de la infec- ción de en- sayo
385	2794 2830 2832	10,0 ml subcutánea	A ₅ - Hannover Método del tra- po de lana	90	} Inmunes
390	2910	Control de infección		-	Enfermó de manera ge- neral
395	2837 2838 2840	10,0 ml subcutánea	C - Tölz Método del tra- po de lana	90	} Inmunes
	2908	Control de infección		-	Enfermó de manera ge- neral



301232

400 Ejemplo 5

Con 200 ml de cada una de las suspensiones de las razas de virus O₂ - Normandía (contenido de virus 10^{7,1} TCID₅₀/ml), A₅ - Hannover (contenido de virus 10^{6,5} TCID₅₀/ml) y C -Tölz (contenido de virus 10^{7,5}TCID₅₀/ml - obtenidas como en los
405 Ejemplos 1, 2 y 3 - 30 ml de saponina al 10%, 360 ml de una suspensión de hidróxido de aluminio al 2% y 10 ml de una solución de formaldehído, se obtienen 1.000 ml de una vacuna de glosopeda trivalente de los tipos O, A y C.

Con la vacuna de glosopeda preparada de este modo se va-
410 cunan por vía subcutánea 9 reses vacunas jóvenes con una dosis de 10 ml. A los 17 días, se comprueba la inmunidad por el método del trapo de lana.

En la Tabla siguiente se indican los resultados, que muestran que los animales tratados previamente con la vacuna
415 obtenida según la invención fueron inmunes a los 3 tipos (O,A y C), mientras que los animales de control enfermaron en cada caso de glosopeda del tipo con el cual habían sido infectados.



301232

Res vacuna nº	Dosis de in- oculación. Modo de in- oculación	Virus de infección Modo de infección	Infección de ensayo a los ... días p.v.	Resultado de la in- fección de ensayo
420				
425	2925 2926 2927	10,0 ml subcutánea	O ₂ -Normandía Método del tra- po de lana	17 } Inmunes
430	2934	Control de infección	-	Enfermó de manera ge- neral
435	2906 2907 2921	10,0 ml subcutánea	A ₅ - Hannover Método del tra- po de lana	17 } Inmunes
	2932	Control de infección	-	Enfermó de manera ge- neral
440	2922 2923 2924	10,0 ml subcutánea	C - Tölz Método del tra- po de lana	17 } Inmunes
445	2933	Control de infección	-	Enfermó de manera ge- neral

Ejemplo 6

Como en el ejemplo 3 se inyecta en forma subcutánea a 5 cerdos de tres meses una dosis de 5 ml de la vacuna de virus del 4º pasaje de cultivo de la raza C-Tölz, de un contenido de virus de $10^{7,7}$ TCID₅₀/ml. A los 56 días p.v., los cerdos inoculados fueron reunidos con 2 cerdos no tratados previamente y 2 cerdos infectados por el método del trapo de lana.

Como muestra la tabla siguiente, los cerdos inoculados quedaron protegidos contra el ataque de la glosopeda contrariamente al animal testigo.



301232

460	Cerdo nº	Dosis de in- oculación Modo de in- oculación	Virus de infección Modo de infección	Infección de ensayo a los ... días p.v.	Resultado de la infección de ensayo
-----	-------------	---	---	--	---

465	3050 3051 3052 3053 3054	5 ml subcutánea	Infección por contacto	56	inmunes
470	3057 3058	Controles de contacto	Infección por contacto	-	enfermó de manera general
475	3055 3056	Controles de infección	C-T61z M6- todo del trapo de lana		

Ejemplo 7

120 ml del 4º pasaje de cultivo de tejido de riñón de ter-
 nero de la raza de glosopeda O₂ Normandía, de un contenido de vi-
 rus de 10^{7,1} TCID₅₀/ml, 120 ml del 4º pasaje de cultivo de tejido
 480 de riñón de ternero de la raza de glosopeda A₅ Hannover, de un
 contenido de virus de 10^{7,5} TCID₅₀/ml y 120 ml del 4º pasaje de
 cultivo de tejido de riñón de ternero de la raza C-T61z de glosop-
 485 peda, de un contenido de virus 10^{7,5} TCID₅₀/ml son adicionados con
 15 ml de una solución acuosa de saponina al 10%, con 120 ml de una
 suspensión de hidróxido de aluminio al 2%, cuyo pH ha sido regu-
 lado con tampón de glicocola a 8,3 y tratada con 10 ml de una so-
 lución acuosa de formaldehído, de modo que la concentración final
 de formaldehído en la vacuna es del 0,085%, manteniéndose la masa
 durante 31 horas a 25º C. La preparación, de la suspensión de vi-
 490 rus, se realiza en la forma indicada en el ejemplo 1 o bien 3. La



301232

vacuna así obtenida es estéril y es inofensiva para el ternero y para el ratoncito de tan sólo 5 a 7 días.

Con la vacuna de glosopeda preparada de este modo, se vacunaron por vía subcutánea 9 reses de un año y medio con dosis de 5,0 ml. 120 días p.v. se infectaron tres terneros de ensayo cada vez mediante el método del trapo de lana con virus inactivos de glosopeda de uno de los tres tipos siguientes: O, A o B.

En la tabla siguiente se indican los resultados que nos señalan que, los animales tratados previamente con la vacuna, fueron inmunes, mientras que los animales de control enfermaron en todos los casos de 4 glosopedas.

Res vacuna nº	Dosis de in- oculación Modo de in- oculación	Virus de infección Modo de infección	Infección de ensayo a los ... días p.v.	Resultado de la infección de ensayo
2987 2999 3028	5,0 ml subcutánea	O ₂ Norman' día Método del trapo de lana	120))) inmunes
510 3127	Control de infección		-	enfermó de manera general
515 2988 2993 2997	5,0 ml subcutánea	A ₅ Hannover Método del trapo de lana	120))) inmunes
520 3106	Control de infección		-	enfermó de manera general
525 3036 3037 3039	5,0 ml subcutánea	C-Tölz Método del trapo de lana	120))) inmunes
3121	Control de infección		-	enfermó de manera general



301232

530 Esta solicitud corresponde a la presentada en Alemania
el 22 de Junio de 1.963 bajo el número B 72 384 IVa/30 h, se
acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto
sobre Propiedad Industrial y del artículo 4º del Convenio de
la Unión.

REIVINDICACIONES

- 535 1). Procedimiento para la obtención de una vacuna contra la glo-
sopeda, caracterizado por adicionarse una suspensión de virus
de glosopeda, obtenida sobre cultivos de tejidos de órganos de
animales de pezuña, y especialmente de riñones de ternero, con
saponina de una concentración de 0,1 al 3,5% y preferiblemente
540 del 0,75%, adsorberse los virus de glosopeda sobre un adsorbente,
preferiblemente hidróxido de aluminio tamponado, e inactivarse
a continuación con formaldehído, de manera en sí conocida.
2). PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA VACUNA CONTRA LA
GLOSOPEDA.

545 Esta Memoria consta de diecinueve hojas foliadas y mecano-
grafiadas por un sólo lado de sus caras.

Madrid, 19 de Junio de 1.964

Pablo Agudo Obregón
p. p.