



321833

321833

321833

PATENTE DE INVENCION

a favor de:

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

Memoria descriptiva

La presente invención se refiere a una vacuna para la inmunización de mustélidos, y principalmente de visones y de hurones, contra el moquillo y a un procedimiento para su obtención.

5

El moquillo es una enfermedad viral que puede atacar no sólo a los perros y zorros, sino también a los mustélidos. A los mustélidos pertenecen, entre otros, los visones, los hurones, las martas, las comadrejas, los vesos, los armiños y las martas cebellinas. El moquillo es particularmente peligroso para los visones y, en los criaderos de estos animales, puede conducir a graves pérdidas. Hasta aquí, se ha tratado de ayudarse inmunizando animales sensibles con vacunas que contenían antígenos virales vivos atenuados, adaptados al huevo o a cultivos de tejidos y procedentes de perros infectados con moquillo. Las vacunas de virus de moquillo adaptadas al huevo son obtenidas en tejidos que contie-

10



321833

15 nen albúmina de pollo, mientras que el virus de moquillo adaptado a cul-
tivos de tejidos es multiplicado en tejido de cultivo que contiene albú-
mina de perro.

20 Ahora bien, se ha descubierto un procedimiento para la obtención de
una vacuna para la inmunización al moquillo de mustélidos caracterizado
por adaptarse un virus de moquillo -atenuado por cuando menos 50 pasajes
sucesivos por tejido de cultivo de órganos de perros, preferiblemente te-
25 jido epitelial de riñones de perro (por ejemplo según la Patente de la
República Federal Alemana 1.138.888)- a cultivos de mustélidos, y parti-
cularmente a cultivos celulares de tejido epitelial de riñones de hurón,
y modificarse mediante cuando menos 10 pasajes en serie por tejido de
cultivo de mustélidos.

 Como tejido de cultivo es adecuado tejido de órganos -como por ejem-
plo riñones, bazo, testículos y útero- de mustélidos, por ejemplo de hu-
rones, visones, martas, armiños, comadrejas y martas cebellinas.

30 Después de la inoculación y de una incubación de cuando menos una
semana a 37°C., las células infectadas con virus de moquillo se aglomeran
y forman células gigantes comprobables microscópicamente y que sirven
de indicador de la multiplicación del virus. El virus que se ha formado
en las células es expelido en el medio nutricio que rodea las células y
recogido mediante eliminación del medio que contiene el virus. Como las
35 células que producen virus no son destruidas inmediatamente, es posible
repetir la recolección de virus. Es ventajoso recoger una o dos veces
al día la solución nutritiva que contiene el virus, ya que de otro modo
el virus de moquillo expelido por las células se estropea rápidamente
debido a su termolabilidad.

40 El principio del procedimiento se basa en que virus de moquillo
aislado en perros enfermos de moquillo, adaptado a tejido de cultivos de
órganos de perro y atenuado por cuando menos 50 y preferiblemente 70 pa-
sajes por tales tejidos de cultivo, es transplantado a tejido de cultivo
de mustélidos, preferiblemente de hurones, haciendo que se multiplique
45 en cuando menos 10 pasajes. Con la suspensión de virus así obtenida se
produce, de manera en sí conocida, la vacuna.

 Una forma de ejecución conveniente del procedimiento de la invención
será descrita más detalladamente a continuación. Se obtiene la corteza

321833



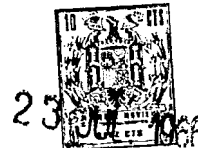
50 renal de riñones de jóvenes hurones o visones, que se desmenuza mecánicamente y se desintegra por vía fermentativa con una solución de tripsina al 0,25% en tampón de fosfato, de pH = 7,6 y 37° C. Se obtiene así una suspensión celular de la cual se elimina la tripsina por centrifugación de la suspensión y lavado ulterior del sedimento de células con solución de cloruro sódico al 0,85% conteniendo tampón de fosfato. A continuación, se suspende el sedimento celular en una relación de 1:400 hasta 1:500 en un líquido de cultivo.

55 El líquido de cultivo está constituido, preferiblemente, por solución de Hank con un 0,5% de hidrolizado de lactalbúmina, un 20% de medio 199 (TCM 199) de cultivo de tejidos, un 20% de suero de ternera, 100 unidades de penicilina, 50 gama de estreptomycin por ml., así como un 0,01% de rojo de fenol. Mediante adición de bicarbonato sódico, se regula el líquido de cultivo sobre un valor pH de preferiblemente 7,5. Como líquido de cultivo son adecuados, además de la solución de Hank, el medio TCM 199, la solución de Earle con hidrolizado de lactalbúmina y líquido llamado "amnión".

65 La suspensión de células es incubada en los recipientes de cultivo a una temperatura de aprox. 35 a 37°C., fijándose las células renales sobre la pared de cristal y multiplicándose por división celular. A los 4-5 días, se renueva el líquido nutricio. La solución de alimentación se distingue del líquido de cultivo anteriormente indicado por el hecho de contener tan sólo un 10% de suero de ternera, en lugar de un 20%. Cuando la alfombra de cultivo celular se ha desarrollado -corrientemente después de otros 2 a 3 días- se inocular en una relación de 1:20 a 1:200 -es decir, con 1 parte de suspensión de virus cada 20 a 200 partes de solución nutritiva- con virus de moquillo del 70° pasaje de cultivo en tejido de perro.

70 Para la cría del virus y sucesiva multiplicación de virus en pasajes en serie, se emplea preferiblemente, como solución nutritiva y de cultivo, solución de Earle con un 0,5% de hidrolizado de lactalbúmina y un 2% de suero de caballo. El líquido nutricio y de cultivo recibe una adición de antibióticos de 100 unidades de penicilina y 50 gama de estreptomycin por ml y es regulado con bicarbonato sódico sobre un valor pH comprendido entre 7,0 y 8,0, y preferiblemente de 7,5.

321833

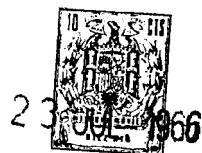


85 La cría y la multiplicación de virus es efectuada a temperaturas comprendidas entre 28° y 38°C., y preferiblemente de 37°C. A continuación de la cría de virus, se cría el virus de moquillo adaptado al tejido de riñones de hurón o de visón, durante cuando menos 10 pasajes sucesivos, en tejido epitelial de riñones de hurón o de visón. Las células del tejido de cultivo producen virus que ceden al medio nutritivo ambiente. La célula no muere a consecuencia de ello, sino que forma con las células contiguas células del tipo llamado gigante. La producción de virus no queda interrumpida por ello, como es el caso con la destrucción de las células, sino que continúa durante varios días. Gracias a ello, es posible obtener, después de la renovación del medio nutritivo, 95 varias cosechas de suspensión de virus provista de todo su valor. Por fin, las células gigantes se agotan.

De la misma manera que en los cultivos primarios descritos, los virus de moquillo pueden ser criados también en células secundarias, siendo sometidos a los pasajes en serie. Pueden prepararse por ejemplo de la siguiente manera cultivos secundarios. Se adicionan cultivos primarios bien desarrollados con una solución de tripsina al 0,1% hasta 0,25%, o con una solución al 1:5000 de ácido disodio-dihidrógeno-etilendiamin-N,N'-tetraacético. Se deja actuar la solución sobre el cultivo a 37°C. hasta que las células se separan del conjunto de células y respectivamente del fondo de cristal. Se sifona la suspensión de células y se obtiene el sedimento de células por centrifugación, por ejemplo a 1000 r.p.m. Mediante una nueva suspensión del sedimento de células en medio de cultivo y nueva centrifugación, se eliminan los restos de tripsina o de ácido disodio-dihidrógeno-etilendiamin-N,N'-tetraacético. Se suspende el sedimento celular obtenido - de la manera descrita para los cultivos primarios - con líquidos nutritivos o de cultivo y se realiza el cultivo de tejido y la multiplicación de virus de la manera descrita. También es posible continuar cultivos secundarios en ulteriores pasajes de células. Cuando se emplean cultivos secundarios, el crecimiento celular y la multiplicación de virus se desarrollan más rápidamente y el rendimiento de virus es mayor.

La obtención de una vacuna partiendo de la suspensión de virus de

321833



120 moquillo se verifica de manera en sí conocida. Es conveniente añadir un agente adyuvante, como por ejemplo hidróxido de aluminio, y obtener por liofilización un preparado seco. La suspensión que contiene el virus de moquillo puede ser preparada, por ejemplo, en la relación de mezcla siguiente en vacuna:

- 25 % de suspensión de virus de moquillo,
- 60 % de caldo de gelatina (2% de gelatina) de pH 7,6,
- 125 15 % de solución de glucosa (50% de glucosa).

La vacuna según la invención posee, por regla general, un contenido de $3 \text{ ID}_{50}/\text{ml}$ hasta $10^6 \text{ ID}_{50}/\text{ml}$, y preferiblemente de $10^3, 5 \text{ ID}_{50}/\text{ml}$ hasta $10^{4,5} \text{ ID}_{50}/\text{ml}$ de virus de moquillo.

130 La vacuna así obtenida es introducida en ampollas y secada preferiblemente por procedimiento liofílico. Convenientemente, se cierran las ampollas previa evacuación. El producto así obtenido contiene virus de moquillo vivos y apatógenos en estado seco, y por tanto duraderos durante mucho tiempo, siendo muy adecuado -previa nueva disolución en un disolvente por ejemplo agua destilada con tampón- para la inmunización contra el moquillo de mustélidos y principalmente de visones y de hurones. Antes de la inoculación, se disuelve el producto seco con agua destilada tamponada con fosfato. El producto del procedimiento puede ser aplicado mediante inoculación, siendo sin embargo también posible inmunizar a los mustélidos mediante un tratamiento llamado de pulverización. Es sorprendente comprobar que el tratamiento de pulverización, muy importante, por ejemplo para las granjas de animales de pieles valiosas, y que constituye una forma de ejecución preferida del procedimiento de la invención, conduce con muy buenos resultados a una inmunización, mientras que las vacunas conocidas y corrientes del comercio (por ejemplo, 135 las obtenidas según la Patente alemana 1.138.888) que pueden compararse con él son completamente inadecuadas para el tratamiento por pulverización.

140 En los mustélidos, el producto del procedimiento es aproximadamente diez veces más eficaz que los preparados obtenidos por ejemplo, según 150 la Patente alemana 1.138.888. Es sorprendente el hecho de que el virus obtenido de perros enfermos de moquillo, adaptado a tejidos de cultivo



321833

de perros y atenuado por cuando menos 50 pasajes sucesivos por el mencionado tejido de cultivo, puede ser criado en tejido de mustélidos. No era de prever que el virus de moquillo adaptado a tejido de cultivo de mustélidos y criado ulteriormente en diez pasajes en tal tejido de cultivo, por ejemplo tejido epitelial de riñones de hurones, actuase en los mustélidos en una dilución más de diez veces superior y revelase un nivel de anticuerpos aproximadamente diez veces superior al de las vacunas conocidas en el estado actual de la técnica.

160 Ejemplo 1

Para cultivar el virus de moquillo en cultivo de tejido, se emplean hurones sanos y preferiblemente jóvenes que, para comprobar su estado de salud, son mantenidos y observados durante aproximadamente 10 días en recintos aislados. Para la obtención de cultivo de tejido, se matan los hurones y se sacan inmediatamente después los riñones en las condiciones de la mayor esterilidad posible. Dentro de una cámara estéril se sacan las cápsulas renales, se quitan las partes de tejido conectivo de la pelvis renal y se corta la corteza de los riñones en trocitos que se recogen en un recipiente y se lavan en agua destilada con un 10% de solución-tampón de fosfato. A continuación, se ponen los trocitos de riñones en un recipiente llamado de tripsinación. En condiciones de esterilidad, se alimenta una solución de tripsina al 0,25% calentada a 37°C. aproximadamente. Agitando constantemente mediante un agitador magnético, se verifica la tripsinación, es decir que, bajo la acción de este fermento, se separan de los trozos de tejido células individuales de los riñones. La acción de la tripsina dura de 20 a 25 minutos aproximadamente. Se decantan en un recipiente las células de los riñones suspendidas en la solución y se recogen. Para interrumpir la operación de tripsinación, se coloca el recipiente de recogida en un baño de agua helada. Luego, se elimina la tripsina por centrifugación. Para ello, se vierte la suspensión de células renales en tubos de centrifugadora y se someten a centrifugación durante aprox. 5 minutos a unas 1000 r.p.m. Se suspende el sedimento con agua destilada con tampón de fosfato y se vuelve a centrifugar a 600 r.p.m., con lo cual quedan flotando también los glóbulos de la sangre, que pueden ser eliminados.

El sedimento celular así obtenido es suspendido en una solución nutricia en una relación de 1:300 hasta 1:400. La solución nutricia empleada

321833



190 para la suspensión está constituida ventajosamente por solución de Hank
con un 0,5% de hidrolizado de lactalbúmina, un 20% de suero de ternero,
100 unidades de penicilina y 50 gama de estreptomocina por ml., así como
0,01% de rojo de fenol. La suspensión celular se hace pasar en un sis-
tema estéril sobre gasa, para eliminar los grupos de células más gran-
des, y luego se vierte en recipientes de cultivo como tubitos con borde
laminado, frasquitos cuadrangulares, balones de Fernbach o preferible-
mente balones de los llamados de penicilina. Se incuban los recipientes
195 de cultivo a una temperatura de aprox. 35° - 37° C., fijándose las cé-
lulas renales sobre la pared de cristal y multiplicándose por división
celular. Después de aprox. 4-5 días, hay que renovar el líquido nutri-
cio. Para ello, se decanta la solución nutritiva gastada o se elimina me-
diante un dispositivo de sifón. Para alimentar el cultivo, se emplea so-
lución de Hank con un 0,5% de hidrolizado de lactalbúmina, como se ha
descrito anteriormente, pero con solamente un 10% de suero de ternera.

200 Corrientemente, la alfombra de cultivo se ha desarrollado por com-
pleto a los 2-3 días, de modo que se puede realizar la inoculación con
el virus de moquillo. Para la inoculación, la solución nutritiva es sus-
tituida preferiblemente por solución de Earle, en lugar de solución de
205 Hank, 0,5% de hidrolizado de lactalbúmina, 2% de suero de caballo y
las adiciones anteriormente indicadas de antibióticos y de rojo de fenol.

En los recipientes de cultivo se vierte ahora virus apatógeno de mo-
quillo del 65° pasaje por tejido renal de perros (obtenido según la Pa-
tente alemana 1.138.888) en una relación de 1:20 a 1:200. Los balones
de cultivo vuelven ahora a ser incubados a una temperatura de aprox.
210 35° - 37°. Se sigue microscópicamente la multiplicación del virus de
moquillo.

215 Son alteraciones características debidas a la multiplicación del
virus un aumento de la granulación de las células, la confluencia de
los núcleos de las células con disolución de los límites de las células
mismas formando células del tipo llamado gigante que, corrientemente,
tienen en la mitad un centro granulado y un borde exterior de plasma
con vacuola. Una vez que se han producido estas alteraciones, las cé-
220 lulas ceden continuamente virus al medio nutritivo ambiente. La solu-

321833



225 ción nutricia que contiene el virus es recogida por decantación o si-
fonado. Convenientemente, se alimenta el tejido de cultivo después de
la recolección con medio nutricio fresco (solución de Earle, como an-
teriormente indicado). Como las células atacadas por el virus de mo-
quillo conservan durante algún tiempo su vitalidad, se verifica en un
primer momento una producción continua de virus de moquillo, de modo
que pueden verificarse recolecciones y respectivamente alimentaciones
a ciertos intervalos. De un mismo cultivo pueden obtenerse hasta 9
230 recolecciones. Se somete la suspensión de virus recogida a nueve ul-
teriores pasajes en serie en el tejido de cultivo de riñones de hurón
descrito anteriormente. La recolección de la suspensión de virus es
realizada cada vez de la manera explicada anteriormente.

235 Se mezclan 25 ml de suspensión de virus de moquillo del 10º pa-
saje en serie con 60 ml de caldo de gelatina y 15 ml de solución de
glucosa al 50%. Se ensaya la tolerabilidad y eficacia de la vacuna
así obtenida en hurones y visones, administrándose por vía subcutánea
en una dosis de 1 ml. Todos los hurones y visones vacunados quedan
sanos durante un tiempo de observación de cuatro semanas y no muestran
240 síntoma clínico alguno. Después de una infección de ensayo con virus
de moquillo patógenos, los hurones y visones vacunados quedan sanos,
mientras que los animales de control no sometidos a tratamiento enfer-
man y mueren de moquillo.

Examen comparativo de eficacia:

245 En un ensayo comparativo de titulación realizado con hurones sen-
sibles al moquillo se ensayan la vacuna A obtenida según la invención
y la vacuna B obtenida según el nivel de la técnica. La vacuna A posee
un título de virus de 29.320 TCID₅₀ por dosis (TCID - Tissue culture
infectivity dosis). La vacuna de comparación B, cuyo virus de moquillo
250 había sido obtenido en el 70º pasaje por epitelio renal de perros, con-
tiene asimismo 29.320 TCID₅₀ por dosis. Se disuelven cada vez 3 dosis
de las vacunas A y respectivamente B en 2 ml de disolvente y se preparan
diluciones decimales. Como se indica en la Tabla I, se vacunan por vía
subcutánea con diluciones de vacuna grupos de animales constituidos
255 corrientemente por 2 hurones. Se comprueba serológicamente la formación
de la inmunidad al moquillo mediante investigación de los anticuerpos

321833

20

6

260 que neutralizan el virus del moquillo, y clínicamente mediante una in-
fección de ensayo con virus patógeno de moquillo. Para investigar los
anticuerpos del moquillo, se obtiene de cada uno de los hurones, a los
14 días y respectivamente 4 semanas después de la inoculación, una mues-
tra de sangre mediante punción en el corazón. El suero así obtenido es
investigado en el ensayo de neutralización del virus para comprobar la
presencia de anticuerpos neutralizadores del virus del moquillo en el
cultivo de tejido. Una vez concluida la toma de sangre, se infecta por
265 vía subcutánea cada uno de todos los hurones con 1 ml de una suspensión
de virus que contiene un virus patógeno de moquillo. Todos los hurones
no inmunes serológicamente enferman y mueren de moquillo.

En el ensayo comparativo de titulación realizado con hurones, se
comprueba que una vacuna obtenida por el procedimiento de la invención
270 en hurones protege todavía en una dilución de 10.000 veces, con un con-
tenido de virus de 2,9 TCID₅₀, el 50% de los animales vacunados, mien-
tras que una vacuna de comparación obtenida por el procedimiento corrien-
te no consigue todavía inmunizar el 50% de los animales vacunados sino
con una dilución de 100 veces y con un contenido de virus de 293 TCID₅₀.

275 Como resulta de los exámenes comparativos de eficacia, la eficacia
inmunizadora de la vacuna obtenida según la invención es más de 10 veces
superior a la de las vacunas de comparación.

Ejemplo 2

280 Se cubre con una capa de solución de tripsina al 0,2% un cultivo
primario de tejido epitelial de riñones de hurón preparado según el Ejem-
plo 1 para el 10^o pasaje de virus de moquillo, y se mantiene durante dos
horas a 37°C. Las células se separan de la pared de cristal y del con-
junto de células. Se centrifuga la suspensión de células a 1000 r.p.m.
aproximadamente, se lava con medio de cultivo el sedimento de células
285 y se vuelve a centrifugar. El sedimento celular ya sin tripsina es ver-
tido en dos recipientes de cultivo. La alfombra de células así obtenida
es inoculada con virus de moquillo. La inoculación, la multiplicación
y la recolección son realizadas de la manera descrita en el Ejemplo 1.
El rendimiento de los dos balones con cultivos secundarios equivale apro-
ximadamente al valor doble del rendimiento de un balón de células prima-
290 rias.



321833

Ejemplo 3

En las jaulas de 3 hurones sensibles al moquillo se pulveriza vacuna, obtenida según el Ejemplo 1, en una dosis de aprox. 1 ml. Un cuarto hurón queda como control no sometido a tratamiento. A las tres semanas de la aplicación por pulverización, se toma de cada hurón una muestra de sangre mediante punción en el corazón. Como puede verse por la Tabla siguiente, los tres hurones tratados con pulverización poseen un elevado contenido de anticuerpos en el suero. El suero del animal de control, por el contrario, no contiene anticuerpos neutralizadores del virus del moquillo.

El resultado serológico es confirmado por una infección de ensayo con virus patógeno de moquillo (1 ml). Los animales cuyas jaulas habían sido tratadas con pulverización quedan perfectamente sanos, mientras que el animal de control enferma y muere de moquillo.

305

Inmunización de hurones con vacuna pulverizada

Hurón nº	Pulverización con	Curso clínico después de la vacunación	Contenido de VND de moquillo a las 3 semanas después de la vacunación	Infección de ensayo con virus patógeno de moquillo
310	561) 1 ml de la	n.e.	más de 215.000	sano
	563) vacuna en	n.e.	más de 215.000	sano
	564) cada jaula	n.e.	más de 215.000	sano
315	565 animal de control no tratado	n.e.	ausencia de VND	murió +

VND de moquillo = dosis neutralizadoras del virus de moquillo.

n.e. = nada especial.

+ = enfermó con síntomas típicos de moquillo y murió.

El ensayo muestra que la vacuna obtenida según la invención permite conseguir, incluso administrada en pulverización, un seguro efecto inmunizador.

Ejemplo 4

Se ponen 8 visones sensibles al moquillo, en grupos de dos, en jaulas.



321833

325 Se someten los grupos 1, 2 y 3 a un tratamiento con pulverización de distintas cantidades de una vacuna obtenida según el Ejemplo 1. El grupo 4 queda como control no sometido a tratamiento.

330 Los visones del grupo 1 son pulverizados cada uno con 1 ml (una dosis de inoculación), los visones del grupo 2 cada uno con 0,2 ml (1/5 dosis de inoculación) y los visones del grupo 3 con 0,04 ml (1/25 de dosis de inoculación). La vacuna contenía cada ml 633 ID₅₀ del virus atenuado de moquillo, cada 0,2 ml 126 ID₅₀ y cada 0,04 ml 25 ID₅₀.

335 A las tres semanas de la aplicación de la pulverización, se toma a todos los visones, incluso los de control, una muestra de sangre mediante punción en el corazón para comprobar su contenido de anticuerpos contra el moquillo. Al realizarse a continuación, a título de ensayo, una infección con virus patógeno de moquillo (raza de Snyder-Hill) por vía subcutánea (0,5 ml), los animales vacunados de los grupos 1 y 2 quedan todos sanos, sin excepción. De los dos visones del grupo 3, uno el 9º día después de la infección de ensayo, muestra pasajeramente falta de apetito y ojos húmedos. Los visones del grupo 4 enferman y mueren de moquillo; se pudo comprobar en distintos órganos, mediante la reacción de fijación del complemento, la presencia del virus.

345 El ensayo confirma que la vacuna obtenida según la invención es adecuada para la inmunización por pulverización de mustélidos. Mientras que, con la inmunización por pulverización con vacuna contra el moquillo adaptada a la albúmina de huevo, sólo el 75% de los animales queda inmunizado después de la administración de una dosis de vacuna (J. Amer. Vet. Med. Ass., tomo 125 (1954), página 134), con la vacuna según la invención se consigue no sólo un efecto inmunizador del 100% con una dosis de vacuna, sino que resulta que es activo incluso 1/25 de la misma. 350 El resultado de los ensayos está indicado en la Tabla siguiente.

Inmunización de visones por pulverización de vacuna

Visones del grupo nº	Cantidad pulverizada administrada	Cantidad de virus de moquillo pulverizada	Curso clínico p.v.	Media de la VND de moquillo adquirida a las 3 semanas p.v.	Infección de ensayo con virus patógeno de moquillo a las 3 semanas p.v.
355	1 ml	633 ID ₅₀	n.e.	981.000	sanos
360	0,2 ml	126 ID ₅₀	n.e.	807.000	sanos
	0,04 ml	25 ID ₅₀	n.e.	503.000	sanos +
4	control	0	n.e.	0	enfermaron de moquillo y murieron + +

365 + = 1 visón mostró pasajeramente, a partir del 9º día después de la infección de ensayo, ojos húmedos y poco apetito.

+ + = quedó demostrada mediante reacción de fijación del complemento, la presencia de virus de moquillo en los órganos.

Explicación de los signos: ID₅₀ = dosis infecciosa al 50%.

VDN de moquillo = dosis neutralizadoras de virus de moquillo p.v. = después de la vacunación.

370

321833

23



Exámen comparativo entre la eficacia de la vacuna A obtenida según la invención y la de una vacuna B obtenida según la Patente alemana 1.138.888.

Grupo de animales nº	Vacunados con vacuna A	Inmunidad ⁺⁺ comprobada serológicamente y clínica y clínicamente	Grupo de animales nº	Vacunados con vacuna B	Inmunidad ⁺⁺ comprobada serológicamente y clínicamente
375	1 1/10 de dosis = 2932 TCID ₅₀	inmune	6	1/10 de dosis = 2932 TCID ₅₀	inmune
380	2 1/100 de dosis = 293 TCID ₅₀	inmune	7	1/100 de dosis = 293 TCID ₅₀	50% inmune 50% no inmune +
385	3 1/1000 de dosis = 29 TCID ₅₀	inmune	8	1/1000 de dosis = 29 TCID ₅₀	no inmune
390	4 1/10000 de dosis = 2,9 TCID ₅₀	50% inmune 50% +	9	1/10000 de dosis = 2,9 TCID ₅₀	no inmune +
	5 1/100000 de dosis = 0,2 TCID ₅₀	no inmune +	10	1/100000 de dosis = 0,2 TCID ₅₀	no inmune +

⁺⁺ La inmunidad fué comprobada por la presencia de anticuerpos neutralizadores de virus de moquillo 14 días y respectivamente 4 semanas después de la inoculación y mediante ulterior infección de ensayo con virus patógeno de moquillo.

TCID₅₀ = dosis infecciosas al 50% de cultivos de tejido.
+ = murieron de moquillo.



321833

23



395 Esta solicitud corresponde a la presentada en Alemania el 19 de Enero de 1.965 bajo el número B 80 160 IVa/30h, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto de la Propiedad Industrial y del artículo 4º del Convenio de la Unión.

REIVINDICACIONES

- 400 1). Procedimiento para la obtención de una vacuna para la inmunización de mustélidos contra el moquillo (fiebre contagiosa de los perros) constituida por un virus de moquillo atenuado por cuando menos 50 pasajes sucesivos en tejido de cultivo de órganos de perros, y preferiblemente de tejido epitelial de riñones de perros, caracterizado por someterse el virus atenuado de moquillo a cuando menos 10 pasajes en serie en tejido de cultivo de mustélidos.
- 405 2). Procedimiento según la reivindicación 1), caracterizado por emplearse como tejido de cultivo de mustélidos cultivos de células de tejido epitelial de riñones de hurones.
- 3). Procedimiento según las reivindicaciones 1) y 2), caracterizado por recogerse varias veces el líquido nutricio que contiene el virus.
- 410 4). Procedimiento según las reivindicaciones 1), 2) y 3), caracterizado por emplearse cultivos secundarios de células.
- 415 5). Procedimiento para la obtención de una vacuna para la inmunización de mustélidos contra el moquillo, caracterizada por un contenido de virus de moquillo atenuado por cuando menos 50 pasajes sucesivos en tejido de cultivo de órganos de perro, y preferiblemente de tejido epitelial de riñones de perro, y llevados luego por cuando menos 10 pasajes en serie en tejido de cultivo de mustélidos.
- 6). "PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCION DE UNA VACUNA CONTRA EL MOQUILLO".

Esta Memoria consta de catorce hojas foliadas y mecanografiadas por un sólo lado de sus caras.

Madrid, 15 de Enero de 1.966

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'Bor' or similar, written over a horizontal line.