

347 036

AB/CV Cde 11318 S.1  
"Vaccin Fièvre aphteuse"

**Memoria descriptiva**



9 DIC 1957

para solicitar **PATENTE DE INVENCION** por **20 años**

a nombre de **INSTITUT FRANCAIS DE LA FIEVRE APTEUSE**

entidad y de nacionalidad **sociedad anónima francesa**

con domicilio en **254 rue Marcel Mérieux, Lyon, Francia**

por: **"PROCEDIMIENTO PARA FABRICAR UNA VACUNA CONTRA LA FIEBRE AFTOSA"** (Clase Internacional G12k)

5-12-67

- 1 -

**POOR  
QUALITY**

# 9 DIC



5

El presente invento se refiere a un nuevo procedimiento de fabricación de la vacuna contra la fiebre aftosa que permite obtener, en condiciones industriales, un rendimiento de producción mayor, así como una vacuna que presenta una mayor actividad biológica.

10

Se sabe que el procedimiento actualmente utilizado para preparar la vacuna contra la fiebre aftosa consiste en cultivar en un medio de cultivo apropiado una cepa de virus de fiebre aftosa sobre epitelios linguales de bovinos, y luego, al final del cultivo, en realizar, después de la molienda, un extracto líquido de los epitelios, lo que permite obtener una suspensión de virus que es luego inactivada para realizar la vacuna.

15

El presente invento tiene por objeto un nuevo procedimiento de fabricación de la vacuna contra la fiebre aftosa, estando caracterizado esencialmente este procedimiento por el hecho de que se colocan los epitelios linguales en el medio de cultivo, se procede a la siembra del cultivo con el virus elegido, después de haber dejado transcurrir un cierto tiempo de cultivo se procede a una primera recolección recogiendo el medio de cultivo que contiene el virus, luego se vuelven a poner los epitelios linguales infectados en contacto con un nuevo medio de cultivo, y después de un segundo tiempo de cultivo, se procede a una segunda recolección de virus recogiendo el líquido del segundo medio de cultivo líquido.

20

25

30

Así, la característica del procedimiento según el invento es utilizar un solo preparado de epitelio lingual para realizar varios cultivos sucesivos con ayuda de medios diferentes que son recogidos y a partir de los cuales



la vacuna es realizada por una inactivación convencional.

5 Aunque en un modo de realización preferido del invento se realizan dos cultivos sucesivos con ayuda de un mismo preparado de epitelio lingual, se puede igualmente, sin salir del marco del invento, realizar mas cultivos sucesivos.

10 Conforme al invento, es igualmente posible proceder a la extracción de los virus que se encuentran en el preparado de epitelios linguales al final del cultivo, pero esta extracción a partir de los epitelios no es una fase obligatoria del procedimiento según el invento, encontrándose la parte mas interesante de los virus recogidos en los medios de cultivo líquido y no en el preparado de epitelios linguales.

15 Conforme al invento, se puede utilizar como medio de cultivo un medio clásico tal como el que es conocido con el nombre de medio de Frenkel.

20 Los tiempos durante los cuales se efectuan los cultivos sucesivos son función de las cepas de virus utilizadas.

25 De una manera general, se obtienen buenos resultados cuando el primer cultivo se efectua durante un tiempo que puede variar entre aproximadamente 15 a 20 horas, mientras que el segundo cultivo se efectua durante un tiempo de aproximadamente 3 a 12 horas.

En cada caso particular, la duración óptima de los tiempos de cultivo puede ser determinada por el examen de la actividad de la vacuna obtenida.

30 Con el fin de hacer comprender mejor el invento,



se describirán ahora a título de ilustración y sin ningún carácter limitativo varios modos de puesta en práctica descritos a continuación.

5 Se toman epitelios linguales en lenguas de bovinos sacrificados desde hace menos de una hora, que se lavan con agua y luego con alcohol, y que se irradian con ayuda de rayos ultravioletas.

Se cortan luego los epitelios con ayuda de una máquina análoga a una máquina de cortar el jamón.

10 Los trozos de epitelios así obtenidos son colocados en un líquido de supervivencia con adición de antibióticos y son mantenidos a una temperatura próxima a 4°C. Pueden ser conservados así como máximo 48 horas y, de preferencia, menos de 24 horas.

15 El cultivo del virus se efectúa colocando los epitelios linguales en el medio de cultivo a razón de 6 epitelios linguales por litro de cultivo.

El cultivo es sometido a una oxigenación continua.

20 Se efectúa a una temperatura constante de 37°C. Esta temperatura es mantenida con ayuda de una circulación de agua en la doble envolvente del recipiente de acero inoxidable en el cual se efectúa el cultivo o con ayuda de cualquier otro dispositivo de regulación de temperatura.

25 En el modo de puesta en práctica descrito, se utiliza un medio de cultivo que corresponde a un medio clásico de Frenkel y cuya composición es la siguiente:

30	PEPTONA	3,000 g
	CISTEINA CLORHIDRICA	0,096 g



	HEMINA	0,036 mg
	INSULINA	0,9 U.I.
	TIROXINA	0,09 mg
	GLUCOSA	1,000 g
5	GLUTAMION	0,01 g
	Na Cl	7,2 g
	K Cl	0,018 g
	Ca Cl <sub>2</sub>	0,18 g
	MgCl <sub>2</sub> , 6H <sub>2</sub> O	0,09 g
10	Na H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,076 g
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0,524 g
	Na H CO <sub>3</sub>	1 g
	Na OH (N)	1,25 ml
	NIACINA	0,00 1 g
15	LISINA	0,200 g
	ARGININA	0,041 g
	METIONINA	0,200 g
	LEUCINA	0,130 g
	ACIDO PANTOTENICO	0,250 mg
20	FENILALANINA	0,025 g
	THIONINA	0,0425 g
	TRIPTOFANO	0,05 g
	HISTIDINA	0,0305 g
	AGUA C.S.P.	1000 ml

25           Veáse a este respecto Dubouclard, Roumiantzeff,  
Fontaine y Machowiak, Bull. Soc. Sci. Vet. Lyon, 1966, 68  
(3), p.243-53.

Se siembra el cultivo con ayuda del virus "C Vosges"  
a razón 10<sup>10</sup> DECP 50 para 30 lenguas.

30           Se recuerda que se designa con el término de DECP



50 la dosis de virus que provoca un efecto citopatógeno en 50% de los casos sobre un ml de cultivo monocelular de células de riñón de cerdo.

5 Se lleva el medio de cultivo a la temperatura de 37°C y se realiza el primer cultivo durante un periodo de 15 horas.

10 Se vacía luego la cuba del primer líquido de cultivo dejando en su sitio los epitelios infectados, luego se reintroduce en la cuba la misma cantidad del mismo medio de cultivo previamente llevado a 37°C y se efectúa el segundo cultivo durante 4 horas.

El cultivo es enfriado luego y el segundo líquido de cultivo es recogido.

15 Las características de los medios líquidos tomados son las siguientes:

Líquido tomado al final del primer cultivo:

- Fijación del complemento: 1/4
- Concentración infecciosa:  $10^{8,4}$  DECP 50/ml
- DVC 50 = 0,20 ml.

20 Líquido tomado al final del segundo cultivo:

- Fijación del complemento: 1/2
- Concentración infecciosa superior o igual a  $10^{9,1}$  DECP 50/ml
- DVC 50 = 0,11 ml.

25 Mezcla obtenida por la reunión de los dos líquidos

- Fijación del complemento: 1/4
- Concentración infecciosa superior o igual a  $10^{9,1}$  DECP 50/ml
- DVC 50 = 0,08 ml.

30 Por DVC 50 se entiende la dosis vacunante sobre



50% de cobayas (véase N.Roumiantzeff, J.Fontaine, C.Stellmann y C.Mackowiak - Ext. Rev. Med. Vet., agosto-septiembre de 1965, 116, p. 597-607).

5 La fijación del complemento se expresa por la dilución límite que dá una fijación completa del complemento por el método semicuantitativo de Kolmer (estudio serológico de los tipos y variantes del virus aftoso por la reacción de fijación del complemento - tesis doctoral Vet., R. Camand, -, 1953, Bosc. edit.).

10 Se comprueba así que las características útiles del líquido resultante del segundo cultivo son superiores a las del líquido procedente del primer cultivo, conduciendo la mezcla de los líquidos a características superiores a las del primer medio de cultivo.

15 A título de comparación y para establecer la superioridad del procedimiento según el invento con relación al estado de la técnica, se efectúa en las condiciones indicadas mas arriba un cultivo del virus "O Flandes" durante un tiempo de 18 horas.

20 Después de este solo y único cultivo, se procede a la extracción de los epitelios linguales en un líquido tampón después de haberlos molido.

Se obtienen las características siguientes:

Líquido de cultivo solo:

25 Fijación del complemento: 1/8  
 Concentración infecciosa:  $10^{8,3}$  DCCF 50/ml  
 DVC 50 = 0,3 ml.

Líquido de cultivo con adición del líquido de extracción:

30 Fijación del complemento: 1/8



Concentración infecciosa:  $10^{8,2}$  DRCP 50/ml

DVC 50 = 0,5 ml.

5 Se comprueba así que la introducción en el líquido del primer cultivo del extracto del epitelio lingual provoca una disminución de las características de la suspensión de virus.

Por el contrario, la incorporación conforme al invento del líquido de un segundo cultivo mejora las características del primer líquido que sobrenada.

10 El líquido virulento obtenido según el invento, después de haber sido refrigerado a aproximadamente  $4^{\circ}\text{C}$ , puede recibir ventajosamente la adición de cloroformo con el cual se deja en contacto durante 12 a 24 horas. Los precipitados son entonces eliminados por centrifugación y el virus es clarificado sobre placas "C 5".

15 Puede ser entonces inactivado para la preparación de vacunas.

20 Esta preparación es clásica. Puede efectuarse, por ejemplo, por adsorción del virus sobre hidróxido de aluminio e inactivación por acción conjugada del formol y del calor.

25 Como se ve, el procedimiento según el presente invento presenta la ventaja de aumentar considerablemente las capacidades de producción de la vacuna contra la fiebre aftosa.

30 En efecto, para una misma cantidad de epitelio lingual, se obtiene una producción por lo menos doble de una vacuna que, por lo demás, presenta cualidades mejoradas con relación a las vacunas fabricadas por el procedimiento corriente.



La presente solicitud que corresponde a la presentada en Francia, con fecha 22 de Junio de 1967, bajo el número PV 111.546, se acoge a los beneficios del artículo 51 del vigente Estatuto sobre Propiedad Industrial.

N O T A

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

10 1.- Procedimiento para fabricar una vacuna contra la fiebre aftosa, caracterizado por el hecho de que después de haber colocado epitelios linguales en un primer medio de cultivo, se siembran con un virus de la fiebre aftosa, y se procede a un primer cultivo, luego se recoge el primer medio de cultivo, se coloca un nuevo medio de cultivo en contacto con los epitelios linguales anteriormente utilizados, se efectúa un segundo cultivo, se recoge el segundo medio de cultivo y, eventualmente, se renueva este mismo procedimiento.

15 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el primer cultivo se efectúa durante un tiempo comprendido entre aproximadamente 15 y 20 horas.

25 3.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que el segundo cultivo se efectúa durante un tiempo de aproximadamente 3 a 12 horas.

9 DIC 1966



4.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que para fabricar la vacuna, se mezclan líquidos procedentes de los dos primeros cultivos.

5

5.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado por el hecho de que para fabricar la vacuna, se añade al líquido de uno o de los dos medios de cultivo, el líquido de extracción de los epitelios linguales.

10

6.- Procedimiento para fabricar una vacuna contra la fiebre aftosa.

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

La presente Memoria consta de diez hojas, escritas a máquina por una sola de sus caras.

Madrid,

P. A.

9 DIC 1966

Alberto de Elzaburu  
Fco. Forgas