



ESPAÑA

19 ES	11 NUMERO	10 A 1
	21 453.727	
	22 FECHA DE PRESENTACION	
	27 NOV. 1976	

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:	32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO		
75 36574	28 Noviembre 1975	Francia

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL	62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
		- - -

64 TITULO DE LA INVENCION

"Procedimiento de vacunación contra la brucelosis"

71 SOLICITANTE (S)

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

149, rue de Grenelle, 75007 París, Francia

72 INVENTOR (ES)

Michel Plommet y Anne-Marie Plommet née Laurent

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

M. Curell Suñol

DE/F2-0677-76-B- I.N.R.A. - "D.9395 - Vaccination conjonctivale"
EX-FR-II

BAD ORIGINAL

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

por VEINTE años

solicitada en España a favor de INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE, de nacionalidad francesa, domiciliada en 149, rue de Grenelle, 75007 Paris, Francia, por "Procedimiento de vacunación contra la brucelosis", con prioridad de la solicitud francesa 75 36574 de fecha 28 Noviembre 1975.-

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente invención se refiere a un nuevo procedimiento de vacunación contra la brucelosis. - - - - -

- La lucha contra la brucelosis animal se conduce de varias maneras según los países y, en el interior de un mismo país, según que se encuentre en una zona de cría intensiva o no, o incluso que la zona esté muy infectada o no. Esta lucha pasa así, o bien por el sacrificio de los animales infectados, o bien por la vacunación sistemática de todos los animales, o bien incluso por una combinación de estos dos métodos. En todos los casos, es necesario que los animales vacunados estén suficientemente protegidos contra la infección y no presenten reacciones positivas a las pruebas ordinariamente utilizadas para
- 5.
- 10.

el diagnóstico de la infección. - - - - -

- Las vacunas, así como los procedimientos de vacunación, habitualmente utilizados, en particular para el tratamiento de los bovinos, no satisfacen en general simultáneamente a estas dos condiciones, o imponen unas condiciones de aplicación relativamente molestas. Así, la vacuna H.38, constituida por bacterias muertas de la cepa Brucella melitensis 53 H 38, aplicada en dos inyecciones más un recuerdo, es muy eficaz pero provoca respuestas serológicas durante largo tiempo después de la vacunación. La vacuna 45/20, constituida por bacterias de cepa Brucella abortus 45/20, utilizada como la H.38, se juzga que no induce respuesta serológica duradera, pero su eficacia es insuficiente. La vacuna más corrientemente utilizada en Francia y en numerosos países es la vacuna B.19, constituida por bacterias avirulentas de cepa Brucella abortus. Esta vacuna, como las precedentes, se administran por inyección subcutánea. Su eficacia, a las dosis normalmente utilizadas, es suficiente para evitar la propagación de la infección de un rebaño a otro. El inconveniente de esta última vacuna es que induce a una respuesta serológica positiva a los métodos usuales de diagnóstico de la infección. Esta respuesta serológica, en las condiciones de utilización habituales (dosis de 9.10^{10} bacterias vivas), se mantiene durante aproximadamente un año y es tanto más larga cuanto más avanzada es la edad en la que se ha practicado. En la práctica, la vacunación debe realizarse entre 4 y 7 meses; más allá de los 7 meses la respuesta serológica sería de muy larga duración. Por la misma
- 5.
- 10.
- 15.
- 20.
- 25.

razón, no es posible, en este modo de vacunación, efectuar un recuerdo. La respuesta serológica positiva sería entonces prácticamente permanente. El nivel de protección está por tanto limitado al conferido por la primera inyección. - - - - -

5. Los límites de edad para la vacunación de los animales determinan de forma imperativa la frecuencia de visita de los rebaños por el veterinario. En el caso de la vacuna B.19, los límites de edad (cuatro a siete meses) necesitan una visita cada tres meses, o sea cuatro visitas por año. - - - - -

10. Además, la identificación de los animales debe llevarse de forma rigurosa; una doble vacunación accidental se traduciría en una respuesta serológica positiva duradera. - - - - -

15. Modificaciones del procedimiento de vacunación por medio de la vacuna B.19 se ha probado sin éxito. Se ha propuesto, en particular, la inyección intracaudal o la inyección intradérmica. En los dos casos, las respuestas serológicas son prácticamente tan molestas como las que se observan con las vacunaciones tradicionales. - - - - -

20. En la literatura, se encuentra la indicación de experiencias en las cuales unas bacterias del tipo Brucella son depositadas sobre la mucosa conjuntiva de los animales. En particular, han sido referidos unos estudios que pretenden determinar la influencia de la inyección de antibióticos en el desarrollo de la brucelosis provocada por bacterias de la cepa virulenta

25. Brucella abortus 544, inoculadas por instilación conjuntiva,

es decir en unas condiciones tan próximas como sea posible a las de la contaminación infecciosa natural. Se ha constatado que, en presencia del antibiótico y en ciertas condiciones, la infección no se había desarrollado en algunos de los animales tratados. Estos estudios no pueden, evidentemente, ser asimilados a unos ensayos de vacunación, debido al carácter virulento de las cepas que han sido utilizadas y a la presencia de los antibióticos que no podían evidentemente más que enmascarar, por lo menos parcialmente, las respuestas inmunitarias y/o serológicas eventualmente provocadas en los receptores por la inoculación de dichas bacterias. - - - - -

La literatura da cuenta también de ensayos comparativos de vacunación de corderos por medio de vacunas del tipo B.19, administradas a dosis idénticas, por vía subcutánea y por instilación en la conjuntiva. Los autores llegan a la conclusión de que los dos modos de vacunación conducen a unos resultados equivalentes y que se observaban en los dos casos reacciones serológicas. - - - - -

Estos resultados no podían por tanto incitar demasiado a los investigadores a explorar aún más unos métodos de vacunación por instilación conjuntiva de composiciones vacunantes (bacterias vivas atenuadas o muertas) en el animal. - - - - -

La invención arranca del descubrimiento de que, contrariamente a todo lo esperado, era posible, colocándose en condiciones adecuadas, realizar vacunaciones por vía conjuntiva, capaces de conferir a los animales tratados una inmunidad

eficaz en ausencia de reacción serológica molesta. - - - - -

5. La invención ha permitido la puesta en evidencia de que existe un intervalo de dosis de bacterias vivas avirulentas o atenuadas, del tipo de las que son o que pueden ser utilizadas para realizar vacunaciones por los medios clásicos, que cuando se administran por instilación conjuntiva, engendran una protección eficaz en ausencia de reacción serológica duradera. - - - - -

10. La invención proporciona además unos tests que permiten la determinación de los límites de los intervalos de dosis antes indicados. - - - - -

15. El procedimiento, según la invención, de vacunación contra la brucelosis, o de recuerdo de vacunación, está caracterizado porque se instila en la conjuntiva del animal tratado una dosis de Brucella viviente de una cepa avirulenta o convertida en avirulenta; en suspensión en un medio compatible con la aplicación sobre la conjuntiva, siendo dicha dosis suficiente para que provoque una colonización de por lo menos uno de los ganglios linfáticos que drenan la zona orbital, y para que, 20. preferentemente, esta colonización pueda ser detectada por una duración de aproximadamente un mes por los menos posteriormente a dicha instilación, no excediendo esta dosis sin embargo, prácticamente, de la que induciría una formación duradera de los anticuerpos humorales responsables de las respuestas positivas 25. en los métodos tradicionales de detección de la infección. - - .

En otros términos, el procedimiento de vacunación según la invención resulta del descubrimiento, por una parte, de que unas cepas bacterianas avirulentas son capaces, cuando se administran por instilación sobre la conjuntiva a unas dosis apropiadas, de franquear el epitelio y de formar unas colonias en los ganglios linfáticos locales y, por otra parte, de que esta colonización, cuando se mantiene un tiempo suficiente, engendra reacciones inmunitarias sin formación importante de anticuerpos humorales. - - - - -

10. Por método usual de detección, se entienden los métodos practicados cuando tienen lugar los controles sistemáticos efectuados por los servicios sanitarios. Estos son, por ejemplo, los métodos de tipo seroaglutinación, fijación del complemento, o de aglutinación por el antígeno ácido al Rosa Bengala. Estos métodos tienen todos por objeto la puesta en evidencia de los anticuerpos humorales específicos cuya formación pueda ser inducida tanto por la infección como por los métodos de vacunación ordinarios utilizados. - - - - -

20. Según la invención, se considera que la formación de los anticuerpos humorales detectados por los métodos de detección de la infección es prácticamente negligible cuando las respuestas a estas pruebas de detección son negativas o, como máximo, son de muy baja amplitud y temporales. En todos los casos, de acuerdo con el procedimiento de vacunación según la invención, las débiles respuestas positivas que se pueden eventualmente constatar no se prolongan nunca más allá de un periodo de tres meses posteriormente a la instilación. - - - - -

25.

Los ganglios linfáticos más directamente interesados por la colonización por las Brucella, consecutiva a la instilación, son los ganglios retrofaríngeos, parotidianos y submaxilares del lado de la cabeza del animal correspondiente al ojo sobre el cual se ha realizado la instilación. Se puede encontrar sin embargo unas Brucella en los ganglios simétricos de los precedentes, así como eventualmente en otros ganglios que los que drenan la región orbital. Según la invención, se considera que un ganglio está colonizado cuando se encuentran en el mismo Brucella vivientes, dicho de otra manera, que se puede, a partir de un extracto convenientemente tratado y colocado en un medio de cultivo apropiado, observar el desarrollo de un cultivo de Brucella. - - - - -

El mecanismo exacto que preside la colonización de los ganglios, a partir de la instilación de Brucella sobre la conjuntiva del animal, no es conocido de forma precisa. Es probable que haya una lesión del epitelio, después captación y transferencia de las bacterias por los fagocitos hasta los ganglios locales. Por medio del canal lagrimal, las Brucella pueden también alcanzar las cavidades aéreas superiores. Es aún más delicado explicar los fenómenos que conducen a disociar en cierto modo la inmunización por mediación celular de la inmunización por mediación humoral, siendo solamente la primera llevada a desarrollarse en las condiciones de la vacunación según la invención. Se puede, a título de hipótesis, suponer que la administración de una cantidad relativamente baja de vacuna por vía conjuntiva -baja con relación a las dosis utilizadas

- ordinariamente según los métodos conocidos de la técnica anterior, como se verá más adelante- limita la difusión del antígeno, de hecho su multiplicación o su supervivencia, a un territorio linfático reducido, el de los ganglios de la región próxima al punto de instilación, y que las células estimuladas en estas condiciones son probablemente particularmente aptas para inducir una respuesta de tipo celular. En estas condiciones, siendo la síntesis de los anticuerpos humorales mínima, no habría competición hacia el antígeno, entre los puntos receptores de linfocitos por una parte y los de las inmunoglobulinas por otra parte. Esto permitiría explicar particularmente el hecho de que la respuesta inmunitaria de tipo celular que se constata así es ya mucho más importante que la que se podría esperar, teniendo en cuenta la baja cantidad de antígeno utilizada para esta vacunación. - - - - -
- 5.
 - 10.
 - 15.

Además, el procedimiento de vacunación según la invención desarrolla en el animal tratado una inmunidad local, particularmente deseable a nivel de la cabeza. Se admite, en efecto, que las mucosas de la cabeza, las vías respiratorias y digestivas superiores constituyan las vías principales de penetración de las Brucella en la contaminación natural. La creación de esta inmunidad local debe, por tanto, traducirse por un incremento muy importante de la protección contra la contaminación natural. - - - - -

El procedimiento de vacunación según la invención puede emplearse solo o en combinación con los procedimientos tradicionales de vacunación. Utilizando particularmente como vacu-

- 20.
- 25.

nación de recuerdo después de una vacunación clásica, permite obtener una protección muy sensiblemente mejorada sin engendrar respuesta serológica molesta. - - - - -

5. Según otro modo de vacunación ventajoso, la primera vacunación, así como la de recuerdo, se efectúa según el procedimiento de la invención. - - - - -

10. En todos los casos en que se efectúa un recuerdo, éste debe tener lugar cuando los efectos de la primera vacunación están suficientemente atenuados. En el marco del procedimiento de vacunación según la invención, el recuerdo desempeña plenamente su función si se practica una vez que la colonización de los ganglios linfáticos ha desaparecido prácticamente, por tanto por lo menos tres meses después de la primera instilación. Preferentemente, el recuerdo se efectúa más de seis meses después de la primera instilación. - - - - -

20. Para la aplicación del procedimiento según la invención para la vacunación de los bovinos, se utilizarán ventajosamente unas Brucella de cepa abortus B.19. La dosis de vacuna instilada sobre la conjuntiva del animal está comprendida, en este caso, entre 10^9 y 10^{10} bacterias vivientes, preferentemente, del orden de $5 \cdot 10^9$ bacterias. La vacuna instilada se halla en una forma concentrada para que la dosis completa quede bien en contacto con el tejido conjuntivo. El volumen instilado es suficientemente pequeño para prevenir las pérdidas posibles por "desbordamiento", de manera ventajosa comprendido entre 0,2 y 0,02 ml y, de forma preferida, del orden de 0,05 ml.

25.

El valor inferior del volumen instilado es tributario del dispositivo utilizado. Debe ser suficiente para que la operación pueda tener lugar con un error relativo aceptable. Se destacará que, en todos los casos, la dosis de bacterias y el volumen instilados permanecen sensiblemente inferiores, respectivamente, a la dosis y al volumen de la vacuna correspondiente inyectada por vía subcutánea según el método tradicional, dosis que es aproximadamente 9.10^{10} bacterias contenidas en un volumen del 1 a 10 ml. - - - - -

10. La edad a la cual los animales son vacunados interviene también de forma muy importante. Es conocido de los prácticos que la reacción de la vacunación es tanto más duradera si ésta se efectúa a una edad más avanzada. En el caso de los bovinos, la vacunación se practica a partir de aproximadamente cuatro meses. Si se quieren evitar reacciones serológicas positivas que se mantienen largo tiempo después de la vacunación, es ventajoso, según la invención, efectuar la vacunación antes de los dos años. - - - - -

20. En un modo particular de vacunación según la invención y aplicado a los bovinos, una primera instilación se realiza en la conjuntiva del animal, de una edad de cuatro a diez meses, con una dosis de aproximadamente 5.10^9 Brucella abortus B.19 vivientes. Una segunda instilación de recuerdo, efectuada en condiciones sensiblemente idénticas a la primera, tiene lugar entre diez y dieciocho meses. - - - - -

25. En otro modo particular de realización de la inven-

- ción, unos bovinos vacunados de forma tradicional, es decir que han recibido por inyección subcutánea una dosis del orden de 9.10^{10} Brucella abortus B.19, a una edad comprendida entre aproximadamente cuatro y siete meses, reciben entre los diez y quince meses un recuerdo de una dosis de aproximadamente 5.10^9 Brucella abortus B.19 por instilación conjuntiva. - - - -
- 5.

- Para la vacunación de los ovinos, según la invención, se utilizarán preferentemente unas bacterias de cepa Brucella melitensis Rev. 1. La aplicación de la vacuna se efectúa en condiciones análogas a las descritas anteriormente a propósito de los bovinos. Las dosis utilizadas en este caso son ventajosamente del orden de 5.10^5 a 5.10^6 bacterias por instilación y, preferentemente, de aproximadamente 10^6 bacterias vivientes.
- 10.

- Los modos de vacunación antibrucelosa descritos precedentemente para los ovinos y los bovinos no son, desde luego, limitativos, en cuanto a la elección de las cepas utilizadas para estas vacunaciones. Otras cepas de Brucella avirulentas pueden utilizarse, en particular las cepas vivientes avirulentas que se utilizan actualmente para la constitución de las vacunas administradas por vía subcutánea. De una manera general, se pueden utilizar cepas vivientes atenuadas o avirulentas aptas para colonizar, a las dosis apropiadas, unos ganglios locales durante por lo menos un mes, sin engendrar reacciones positivas duraderas a las pruebas de diagnóstico de la infección. Asimismo, el procedimiento de vacunación antibrucelosa según la invención se aplica a otras especies animales susceptibles de contraer esta enfermedad y en particular a los capri-
- 15.
- 20.
- 25.

nos y porcinos. - - - - -

5. A título de ejemplo se recurre a las cepas bien conocidas, también utilizadas para la constitución de las vacunas conocidas, tales como la cepa Brucella abortus B.19, registrada bajo el número NCTC 2036; la cepa Brucella melitensis Rev. 1 (disponible en la School of Public Health, University of California, Berkeley, Cal., E.U.A.). - - - - -

10. Para inocular la vacuna, se utiliza una suspensión de las bacterias vivientes en un medio compatible con su aplicación sobre la mucosa conjuntiva. Para evitar desarrollar una reacción de secreción lacrimal en el momento de la aplicación, que podría traducirse por la eliminación de una parte de la dosis inyectada, se utiliza ventajosamente, como medio de suspensión, una solución acuosa salina isotónica. - - - - -

15. Resulta de lo que precede que la invención proporciona por tanto un procedimiento de vacunación antibrucelosa que permite suprimir por lo menos en parte las dificultades encontradas con las vacunas y procedimientos de vacunación tradicionales. Más particularmente, la invención proporciona un procedimiento de vacunación que permite conferir a los animales tratados una protección por lo menos igual a la que se obtiene por los medios tradicionales, sin prácticamente inducir una respuesta positiva, o como máximo una respuesta positiva fugaz, cuando los mismos animales se someten a las pruebas serológicas ordinariamente utilizadas para la detección de la infección. - - - - -

20.

25.

Además, el carácter netamente menos crítico de la edad del animal sometido a estas vacunaciones permite espaciar las visitas regulares de un rebaño por el veterinario. - - - -

- El procedimiento de vacunación según la invención
5. puede realizarse por medio de una vacuna con una presentación farmacéutica que contiene, por una parte, una cantidad determinada de bacterias liofilizadas que corresponde a una o varias dosis unitarias de instilación, y, por otra parte, una cantidad determinada del medio para la puesta en suspensión de
10. las bacterias que corresponden a tantas veces el volumen instilado como dosis unitarias haya de bacterias liofilizadas. El volumen para cada instilación está comprendido ventajosamente en 0,2 y 0,02 ml. - - - - -

- Unas presentaciones farmacéuticas ventajosas para la
15. vacunación de los ovinos o de los bovinos contienen cantidades de bacterias que corresponden a una o varias dosis respectivamente de aproximadamente $5 \cdot 10^9$ Brucella abortus de cepa B.19, o de aproximadamente 10^6 Brucella melitensis de cepa Rev. 1.- -

- Teniendo cuenta de los volúmenes y las dosis de bacterias utilizadas en el procedimiento según la invención, las suspensiones preparadas se hallan en conjunto más concentradas que las que se utilizan habitualmente para las inyecciones subcutáneas. Por ejemplo, para la vacuna B.19 aplicada a los bovinos, la dosis eficaz administrada por vía conjuntiva es del orden de $5 \cdot 10^9$ en un volumen que varía de 0,02 a 0,2 ml, o sea
20. una concentración de $25 \cdot 10^{10}$ a $2,5 \cdot 10^{10}$ bacterias por ml. Cuan-
- 25.

do se recurre al volumen preferido de 0,05 ml para cada dosis, esta concentración es por tanto del orden de 10^{11} bacterias por ml. - - - - -

5. En un modo particular de presentación farmacéutica las bacterias liofilizadas están contenidas en una ampolla sellada, y el medio de suspensión en un recipiente que preserva su esterilidad. - - - - -

10. Eventualmente, la presentación farmacéutica contiene también un dispositivo para la medida y la aplicación del volumen instilado. Este dispositivo puede ser ventajosamente del tipo cuentagotas o microjeringa. - - - - -

15. La presentación farmacéutica mencionada contiene ventajosamente un número de dosis unitarias suficientes para las vacunaciones efectuadas en una jornada por el practicante. De esta manera, la preparación exactamente dosificada, que requiere un cierto cuidado, no tiene lugar más que una vez por día.-

20. Otras características y ventajas del procedimiento según la invención aparecerán en los ejemplos dados a continuación. Estos ejemplos no tienen desde luego ningún carácter limitativo. - - - - -

Ejemplo 1

El modo de vacunación según la invención ha sido probado en el cobaya con la ayuda de Brucella de cepa B.19. Este ensayo permite una comparación cómoda de la eficacia del pro-

cedimiento según la invención con los procedimientos tradicionales; para estos últimos, en efecto, el protocolo oficial de control se efectúa sobre el cobayo (Thornton D. H., Muskett J.C., 1972, L. comp. Pathol. 82, 201-208). - - - - -

5. Unos cobayos han recibido unas dosis variables de vacuna Brucella abortus B.19, o bien por vía conjuntiva, o bien por vía subcutánea, una vez o dos veces con tres meses de intervalo. Las respuestas serológicas en aglutininas o anticuerpos que fijan el complemento han sido seguidas, en ciertos lotes, en 4 a 6 cobayos escogidos al azar. La resistencia conferida por vacunación ha sido probada por inculación intramuscular de $5 \cdot 10^3$ B.abortus 544, tres meses después de la vacunación primera o del recuerdo, después de búsqueda e identificación de las Brucella en el bazo y los ganglios linfáticos, 40 días más tarde. - - - - -
- 10.
- 15.

En estos ensayos, las inyecciones subcutáneas (SC) de vacuna, o intramusculares (IM), para la inoculación se realizan con 0,2 ml de volumen. Las instilaciones conjuntivas se realizan con $5 \mu\text{l}$ con la ayuda de una microjeringa. - - - - -

20. Los extractos de bazo o de ganglios extraídos se cultivan para hacer aparecer las colonias de Brucella. Se indica el grado de infección del bazo por el valor del log. decimal del número de Brucella. Los animales se dicen protegidos cuando no se detecta la presencia de Brucella, lo que se nota por el valor 0. - - - - -
- 25.

Los exámenes serológicos se realizan sobre unas mues-

5. tras extraídas por punción cardiaca, por dosificación de las aglutininas y de los anticuerpos que fijan el complemento según el método Microtiter descrito por Renoux G, Plommet M., Philippon A. (1971, Ann. Rech. vétér. 2, 263-269) partiendo de una dilución a 1/5 y con respecto al rueda de referencia que titula para las dos reacciones 1/640.-----

Los resultados de los ensayos de protección se dan en la tabla 1.-----

Tabla 1

Vacunación			Protección		Intensidad de infección de la rata
Dosis	Número de administraciones	Modo	a	b %	
1.10 ⁶	2	CR	16/34	47	2,69
1.10 ⁷	2	CR	18/36	50	1,93
1.10 ⁸ + 1.10 ⁹	2	CR	12/20	60	1,02
1.10 ⁶	2	SC	12/16	75	0,77
7.10 ⁹	1	SC	23/57	40	2,57
7.10 ⁹ + 1.10 ⁶ 1.10 ⁷	2	SC + CR	32/56	57	1,86
testigos	-	-	0/45	0	5,61

- a) cobayos protegidos
- b) número total de cobayos
- CR instilación conjuntiva
- SC inyección subcutánea

5. Estos resultados muestran que la protección expresada por el porcentaje de cobayos hallados no infectados en la autopsia es de 40% para los lotes de cobayos vacunados de forma tradicional por vía subcutánea, a la dosis normal de prueba de $7 \cdot 10^9$ bacterias. Una vacunación de recuerdo, realizada según la invención, con una dosis de $1 \cdot 10^6$ ó $1 \cdot 10^7$ bacterias, eleva la protección a 57%. Una vacunación y un recuerdo efectuados según la invención conducen, según la dosis ($1 \cdot 10^6$ ó $1 \cdot 10^9$), a una protección de 47 y 60%. Todos los animales testigos están infectados. - - - - -

15. Las respuestas serológicas a la vacunación por vía conjuntiva a las dosis de $1 \cdot 10^6$ y $1 \cdot 10^7$ bacterias vivientes son débiles y temporales, incluso después de vacunación de recuerdo; las mismas son inferiores a las que resultan de una vacunación por vía subcutánea a la dosis de $1 \cdot 10^6$ bacterias, y muy inferiores de las que resultan de la vacunación normal de prueba, a la dosis de $7 \cdot 10^9$ bacterias, por vía subcutánea. - -

20. Estos resultados muestran, en particular, que dos instilaciones de vacuna B.19 de baja dosis confieren una protección superior a la de la vacunación tradicional de prueba sin engendrar sin embargo respuesta serológica molesta. - - -

25.

Ejemplo 2

5. Se han practicado unos ensayos para determinar las condiciones de aplicación de la vacunación conjuntiva según la invención en unos bovinos. A este efecto, se ha seguido la evolución de las respuestas serológicas postvacunales y la colonización de los ganglios linfáticos para diferentes dosis de vacuna. - - - - -

10. 71 terneros, de una edad de cuatro meses aproximadamente, han recibido por vacunación conjuntiva unas dosis que varían de 1.10^6 a 1.10^{10} bacterias vivientes, de una suspensión fresca o liofilizada, de la cepa B.19. Los terneros han sido sangrados, y después se les ha realizado la autopsia 15 ± 2 ó 30 ± 2 días más tarde. Las Brucella vacunales han sido buscadas en los ganglios linfáticos parotidianos (P), submaxilares (M) y retrofaríngeos (RP). Las respuestas serológicas postvacunales se miden por las pruebas de aglutinación (AGG), de fijación del complemento, de Coombs, y, para la última parte de la experiencia, por la aglutinación sobre lámina con la ayuda del antígeno ácido al Rosa Bengala. - - - - -

20. Los terneros utilizados para estos ensayos tienen una edad de 3,5 a 4,5 meses en el momento de la vacunación. Son sacrificados 15 ± 2 ó 30 ± 2 días más tarde. Las extracciones sanguíneas y de los ganglios tienen lugar en la autopsia. - - -

25. Las vacunaciones han sido efectuadas o bien a partir de cepas frescas de B.19, o bien a partir de bacterias liofili-

zadas. En los dos casos los resultados son análogos. Los dos tipos de suspensión se obtienen como sigue. - - - - -

a) Suspensión fresca

5. El cultivo se realiza en cajas de Roux, durante 24 horas a 37°C, en un medio de Trypticase Soy Agar (B.D. Mérieux) enriquecido con 1 g por litro de extracto de levadura (Yeast Extract Difco). El cultivo es recogido en solución salina tamponada, lavado por centrifugación, tomado de nuevo en la misma solución (suspensión a), ajustada por medida fotométrica a la
10. concentración deseada. - - - - -

b) Suspensión liofilizada

15. La suspensión a) es centrifugada, tomada de nuevo a la concentración aproximada de $5 \cdot 10^{11}$ bacterias vivientes en la solución constituida por: albúmina bovina 5 g, sacarosa
20. 7,5 g, glutamato de sodio 1 g, agua destilada 100 ml, esterilización por filtración sobre membrana Millipore de 0,45 μ . Esta suspensión b) es repartida en tubos con el volumen de 1 ml, después liofilizada en un aparato Speedivac Edwards 30 Pl. En el momento del empleo, la suspensión es tomada de nuevo en agua
25. destilada, y después llevada a dilución deseada en solución tampón, teniendo en cuenta un valor de supervivencia de 70%. - - - - -

Las suspensiones vacunales fresca y liofilizada se administran por vacunación conjuntiva, por depósito de una gota de 0,05 ml en la superficie del ojo derecho por medio de una pipeta calibrada. - - - - -

Los ganglios extraídos en el matadero son puestos en cultivo o bien inmediatamente, o bien después de conservación por congelación a -20°C durante 3 días como máximo. - - - -

5. Cada ganglio es desengrasado, flameado superficialmente, seccionado en dos, y después tomado en una pinza "masticador", de manera que se exprima el jugo que ha quedado en una caja de medio NB (Renoux G., 1954, Ann. Inst. Pasteur, 37, 325-333). Después de 8 días de incubación a 37°C , se buscan las colonias de Brucella y se identifican. - - - - -

10. Las aglutininas se buscan y titulan por el método standard en tubos (Renoux G. y Gaumont R., 1966, Cahiers du C.N.E.R.N.A., C.N.E.S., Paris) en el caso de suero de ternero, de manera que se practique a continuación, sobre los mismos sueros, la prueba de Coombs por la técnica de FOZ A., 1969, Revista de Diagnóstico biológico 13, 207-217. - - - - -

15. Los anticuerpos que fijan el complemento han sido titulados por el método Microtiter cuyas referencias se han dado en el ejemplo 1; la reacción de aglutinación sobre lámina se realiza con antígeno ácido al Rosa Bengala del Central Veterinary Laboratory, Weybridge, sobre los sueros de los últimos grupos de terneros vacunados, que figuran en la tabla 2 siguiente. - - - - -

20. Todas las pruebas serológicas han sido contrastadas con el suero-referencia del laboratorio, que titula 1000 unidades internacionales aglutinantes (UI), y que da en nuestras 25.

técnicas unas reacciones 50% al 1/640 en aglutinación y fijación del complemento. - - - - -

Los resultados están agrupados en la tabla 2. En esta tabla, las cifras relativas a la colonización corresponden al número de colonias obtenidas según la anotación siguiente: -

5.

1 = 1 a 4 colonias

2 = 5 a 24 colonias

3 = 25 a 124 colonias

4 = más de 124 colonias

10.

0 = indica la ausencia de Brucella

Los títulos de aglutinación son indicados por el inverso de las diluciones positivas, 0 significa $< 1/10$; para el test de Coombs, 0 significa que el título es el mismo que en aglutinación; la reacción es positiva para cualquier título dado; la fijación del complemento es negativa ($< 1/5$) en todos los casos. - - - - -

15.

Tabla 2

Dosis	Número de días después de vacu nac.	Número de terneros	Colonización de los ganglios								Anticuerpos		
			izquierdo				derecho				AGG	Coombs	
			RP	P	M	RP	P	M					
1.06.10 ⁹	17	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3.0.10 ¹⁰	17	6	0	0	0	0	0	0	0,1,1,1,4,1	2,1,3,0,0,2	0	0,0,0,0,0,0,160	0
1.10 ⁹	17	3	0	0,1,0	1,0,0	0	0	0	3,3,2	4,4,2	0,0,10	0	0
1.10 ⁹	31	4	0	0,1,0,0	0,1,0,0	0	0	0	2,2,2,1	0,1,0,0	0,0,10,10	0	0
1.10 ¹⁰	31	6	0	0,0,0,2,1,1	0,1,1,1,1,2	0	0	0	0,1,1,1,0,0	1,2,1,1,0,0	0,20,0,0,10,0	0	0
1.26.10 ⁹	29	5	0	0	0	0	0	0	2,0,1,2,0	0,0,3,0,0	0	0	0
1.16.10 ⁹	15	5	0,2,0,0,0	1,1,0,0,2	0	0	0	0,0,2,0,0	0,3,3,1,0	0,0,3,0,0	0	0	0
5.08.10 ⁹	15	5	0	2,0,0,3,0	0	0	1,4,0,2,3	0	2,0,4,3,0	1,2,0,2,0	0	0	0
5.12.10 ⁹	28	4	0	0	0	0	0	0	3,2,2,1	0,0,1,2	0	0,0,160,160	0
1.0.10 ⁹	14	5	0,0,1,0,0	0	0	0	0,0,3,0,0	0	4,3,0,2,1	0,2,2,0,2	0	0	0
1.0.10 ⁹	28	6	0	0	0	0	0,0,0,1,0,0,0	0,0,0,1,0,0,0	0,0,1,0,1,0	2,1,0,0,0,2	0	0,80,80,0,0,0	0

Esta tabla indica también la dosis administrada, el plazo entre la vacunación y los exámenes, el número de terneros en cada caso. - - - - -

5. La colonización ganglionaria ha sido constatada en 26 de los 34 terneros que han recibido una dosis del orden de 1.10^9 bacterias, y en todos los terneros que han recibido las dosis de 5.10^9 (9/9) y 1.10^{10} (12/12) bacterias. - - - - -

10. Las reacciones serológicas a la vacunación conjuntiva son extremadamente reducidas: 15 ± 2 ó 30 ± 2 días después de la vacunación, cualquiera que sea la dosis administrada, todas las pruebas de fijación del complemento son negativas ($< 1/5$), así como las pruebas antigénicas al Rosa Bengala (realizada únicamente en los terneros de los seis últimos puntos de la tabla 2). Las pruebas de aglutinación muestran en total cuatro reacciones por 1/10 y una al 1/20 (= 30 UI). La reacción Coombs es en total positiva cinco veces, para unas dosis de vacunas superiores o iguales a 1.10^9 bacterias. - - -

20. La dosis de 5.10^9 bacterias, que determina por vacunación conjuntiva una colonización ganglionaria sin inducir una respuesta serológica notable, se considera para los ensayos ulteriores, que tienen por objeto determinar la eficacia de la vacuna administrada a las dosis que responden a las exigencias del procedimiento según la invención y que acaban de ser definidas. - - - - -

Ejemplo 3

La eficacia del procedimiento de vacunación según la invención ha sido determinada por comparación con el modo tradicional de vacunación. - - - - -

5. 74 terneras, de una edad de siete a doce meses, han sido repartidas en cuatro grupos: 8 en el grupo testigo A; 19, en el grupo B, han recibido la vacuna Brucella abortus cepa 19 según el método clásico, o sea $9 \cdot 10^{10}$ bacterias viables por vía subcutánea (VSC); 19, en el grupo C, han recibido una vacuna por el método clásico, después, seis (C1) u ocho (C2) meses más tarde, un recuerdo por vía conjuntiva (VC), en el ojo derecho, con $5 \cdot 10^9$ bacterias; 28, en el grupo D, han recibido dos instilaciones por VC en el ojo derecho con $5 \cdot 10^9$ bacterias, con seis (D1) y ocho (D2) meses de intervalo. - - - - -

15. La vacuna B.19 se prepara como se describe en el ejemplo precedente. Se ha utilizado la cepa liofilizada, puesta en suspensión en una solución salina isotónica. El número de bacterias viables es controlado por cultivo. Las dosis de vacuna administradas son de $9 \cdot 10^{10}$ bacterias en un volumen de 5 ml, para la vacunación subcutánea, y de $5 \cdot 10^9$ bacterias en un volumen de 0,1 ml (2 gotas), para la vacunación conjuntiva. La cepa infectante B. abortus 544 es inoculada a la dosis de $16,4 \cdot 10^6$ bacterias en 0,1 ml por vía conjuntiva. - - - - -

16) Examen serológico

25. Las extracciones sanguíneas se practican cada semana

a partir de la vacunación. Las medidas se efectúan, como se ha indicado anteriormente en el ejemplo 2, por aglutinación, fijación del complemento, o aglutinación sobre lámina en medio ácido con el antígeno al Rosa Bengala (tal como se ha descrito por Nicoletti P., 1967, J. Amer. vet. Med. Assoc., 151, 1776-1783). - - - - -

5.

La reacción serológica se considera positiva: - - - - -

- si su título en aglutinina es igual o superior a 80 UI, lo que corresponde a una aglutinación 100% a la dilución 1/40; -

10.

- si su título en fijación del complemento es igual o superior a 1/5, cualquiera que sea el título en aglutinina. - - - - -

Los resultados se dan en la tabla 3. Esta indica, en función del número de semanas transcurridas desde la vacunación, el número de terneras serológicamente positivas para cada uno de los grupos. - - - - -

15.

Tabla 3

Grupos	Semanas después de la vacunación																											
	0	1	2	3	4	6	8	12	16	20	24	28	29	30	31	32	34	36	37	38	39	41	44	50	53	58	61	
B (19)	0	19	19	19	19	19	19	10	11	10					3	2												
B1 (10)												6	7	8	8	9	3											
B2 (9)												4				2	0	1	9	8	9	1	1	0	0	0	0	0
C (19)	0	19	19	19	19	19	19	19	10	10	10				10	3												
D1 (14)																												
D2 (14)																												
D (28)	0	0	1	0	2	9	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0												

Las cifras entre paréntesis indican el número total de terneras por grupos. Los grupos C y D están divididos en C1, C2 y D1, D2, según la fecha en la cual se ha practicado el recuerdo. - - - - -

5. Se constata que, en el grupo B, la vacunación es seguida de una respuesta positiva durante prácticamente siete meses, e incluso hasta doce y trece meses para dos terneras vacunadas respectivamente a la edad de 8,5 y 10,5 meses. - - -

10. En el grupo C, el recuerdo por vía conjuntiva conduce a una respuesta positiva que se prolonga aproximadamente dos meses. Con respecto al grupo B, se constata que el recuerdo, en la práctica, no prolonga de forma sensible el periodo durante el cual el serodiagnóstico puede ser perturbado por las reacciones postvacunales. - - - - -

15. Finalmente en el grupo D, correspondiente a dos instilaciones, no hay prácticamente respuestas positivas, y las que aparecen son limitadas tanto en su duración como en su intensidad (al máximo 30 UI). - - - - -

20. Las figuras 1, 2 y 3 indican, respectivamente, la evolución de los anticuerpos dosificados por seroaglutinación (SA) y fijación del complemento (CF) en función del tiempo en semanas para: - - - - -

- fig. 1, las terneras del grupo B, seis meses después de la vacunación, y, para los grupos C1 y C2, a partir del recuerdo,-

- fig. 2, las terneras del grupo D, después de la vacunación primaria; - - - - -

- fig. 3, las terneras del grupo D, después de la vacunación de recuerdo. - - - - -

5. 2ª) Medición de la protección

Las 74 terneras precedentes han sido inseminadas a una edad comprendida entre quince y veinte meses. 24, no gestantes o cuyo término de la gestación era demasiado tardía, han sido eliminadas para esta segunda parte de la experiencia: el grupo A ha sido reducido así a 7 animales, el grupo B a 12, el grupo C a 12, y el grupo D a 19. Estas 50 terneras se introducen en un estable estanco de la estación cuando están gestantes de 4½ a 6½ meses, y después inoculadas por depósito de la dosis infectante en el ojo izquierdo. - - - - -

15. Posteriormente a la inoculación, se siguen los resultados clínicos, materializados por el número de partos a término (264 días) y la media de la duración de la gestación.-

Se efectúan también medidas bacteriológicas para determinar el grado de infección. - - - - -

20. La excreción de las Brucella se busca por cultivo en el mucus vaginal post-partum y en el colostrum, cuatro días sucesivamente a partir del parto. Las Brucella se buscan en el bazo, los pulmones y el líquido gástrico de los fetos y terneros muertos de distocia. - - - - -

Las vacas son sacrificadas seis semanas aproximadamente después del parto. 19 ganglios y 10 trozos de órgano son sustraídos, molidos separadamente o en mezcla, y reagrupados en 10 molidos. Cada uno de los diez molidos, los más frecuentemente infectados (ganglios retromamarios, ilíacos y de la cabeza, cuartos de mama) es inseminado en dos cajas suplementarias, puestas en la estufa sin CO₂ para la puesta en evidencia eventual de la cepa de vacuna B.19 que no ha sido encontrada nunca. - - - - -

5.

10.

Para cada animal hallado infectado, una colonia por lo menos es identificada por la aglutinación sobre lámina con los antisueros específicos, la lisotipia, la dependencia hacia 21 CO₂, y la puesta en evidencia del carácter ureasa-negativo, carácter que es propio de la cepa de prueba 544. Todas las cepas aisladas presentaban estos caracteres. - - - - -

15.

Los resultados están relacionados en la tabla 4. En esta tabla están indicados, para cada grupo: - - - - -

- el número total de partos a término,

- la duración media de la gestación,

20.

- el número de terneras en las cuales las Brucella han sido halladas de nuevo,

- el número de terneras infectadas.

Tabla 4

Grupo	Vacunación	Parto a término total	Duración media de gestación en días	Ecus vaginal	Brucella extraída de			Terneras infectadas total
					Colostrum	Organos y ganglios		
A	-	1/7	240,8	7/7	7/7	7/7	7/7	
B	SC	6/12	259,2	11/12	9/12	9/12	11/12	
C	SC + CR	8/11	269,2	6/12	4/12	5/12	6/12	
D	CR + CR	14/19	268,5	10/19	5/17	12/19	14/19	

De forma significativa se constata que la media de infección en los grupos vacunados es muy inferior a la del grupo testigo. El recuerdo por vía conjuntiva incrementa muy netamente la protección obtenida por la vacunación clásica. La vacunación por dos inyecciones conjuntivas da mejor resultados que la vacunación clásica. - - - - -

En la práctica, operando según el modo realizado para el grupo C, se puede reforzar notablemente la vacunación clásica sin inconveniente para las reacciones serológicas. La vacunación tal como se ha efectuado en el grupo D permite evitar las obligaciones ligadas a la horquilla de edad de la vacunación clásica siendo al mismo tiempo más eficaz que ésta y sin dejar anticuerpos a un título significativo. - - - - -

N O T A

Se declaran de novedad y propiedad para España, sus territorios y plazas de soberanía, las siguientes: - - - - -

R E I V I N D I C A C I O N E S

1.- Procedimiento de vacunación contra la brucelosis, caracterizado porque se inyecta en la conjuntiva de los animales tratados una dosis de Brucella vivientes de una cepa avirulenta o convertida en avirulenta, en suspensión en un medio compatible con la aplicación sobre la conjuntiva, siendo dicha dosis suficiente para que proveque una colonización de per lo menos uno de los ganglios linfáticos que drenan la

zona orbital, y para que esta colonización persista aproximadamente por lo menos un mes posteriormente a dicha inestilación, no excediendo esta dosis sin embargo, prácticamente, de la que induciría una formación duradera de los anticuerpos humorales responsables de las respuestas positivas en las pruebas tradicionales de detección de la infección. - - - - -

5. 2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque la dosis no excede de la que induciría la formación de anticuerpos humorales de pequeña amplitud y susceptibles de persistir más allá de un período de tres meses posteriormente a la inestilación. - - - - -

10. 3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque comprende una primera inestilación, seguida de una inestilación de recuerdo efectuada en las mismas condiciones, normalmente como mínimo tres meses después de la primera. - - - - -

15. 4.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque la inestilación se hace en recuerdo de una vacunación tradicional, particularmente por vía subcutánea. - - - - -

20. 5.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque las bacterias utilizadas son del tipo Brucella abortus de cepa B.19 (registrada con el número NCTC 8038). - - - - -

25. 6.- Procedimiento según la reivindicación 5, carac-

terizado porque, para vacunar bovinos, se instila una dosis de vacuna que contiene de 10^9 a 10^{10} bacterias, y preferentemente aproximadamente 5.10^9 . - - - - -

5. 7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque se efectúa una primera instilación a unos bovinos de una edad de cuatro a diez meses, y luego, después de un período de por lo menos tres meses y en los bovinos de una edad entonces de diez a veinticuatro meses, se efectúa una segunda instilación en unas condiciones prácticamente idénticas. - - - - -

10. 8.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque la instilación constituye un recuerdo de una vacunación tradicional por vía subcutánea. - - - - -

15. 9.- Procedimiento según la reivindicación 8, caracterizado porque la instilación se efectúa por lo menos tres meses después de la inyección subcutánea y en unos bovinos de edad de diez a quince meses, habiendo sido efectuada la inyección subcutánea entre los cuatro y siete meses. - - - - -

20. 10.- Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque las bacterias utilizadas son del tipo Brucella melitensis de cepa Rev. 1 (disponible en la School of Public Health, University of California, Berkeley, Cal., U.S.A.). - - - - -

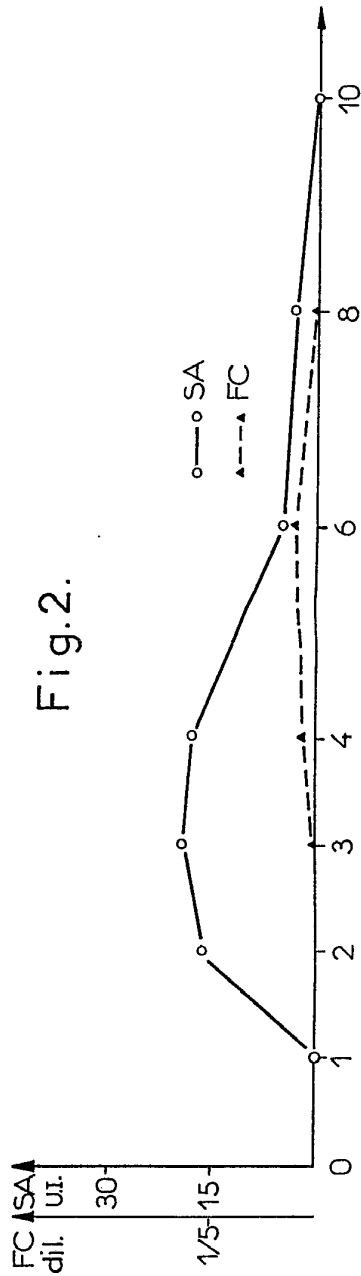
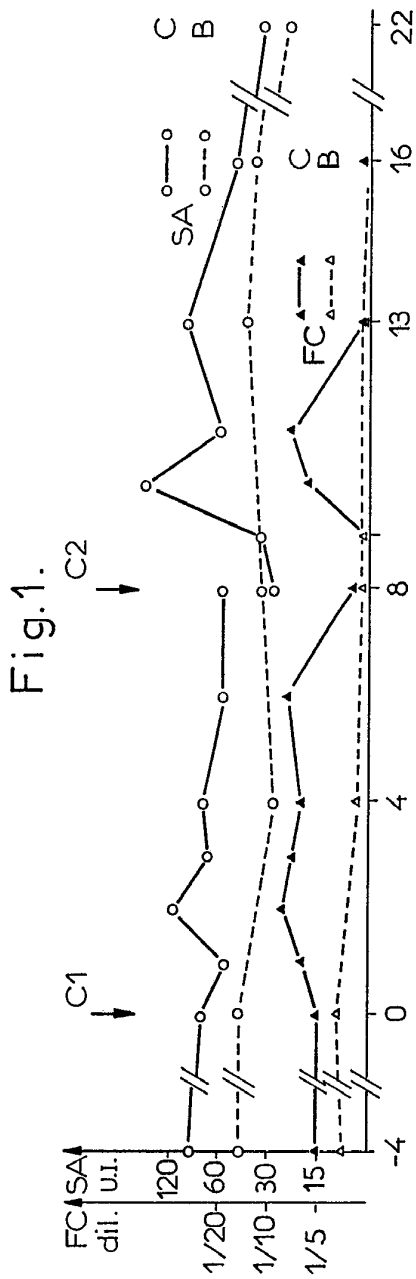
25. 11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado porque, para la vacunación de ovinos, la dosis insti-

lada contiene de $5 \cdot 10^5$ a $5 \cdot 10^6$ bacterias, y preferentemente aproximadamente 10^6 . - - - - -

12.- "PROCEDIMIENTO DE VACUNACION CONTRA LA BRUCE-
LOSIS". - - - - -

5. Todo ello conforme se describe y reivindica en la presente memoria, que consta de treinta y cuatro hojas, foliadas y mecanografiadas por una sola de sus caras y de dos láminas de dibujos que la ilustran.





MADRID, 27 NOV. 1976

P. A. M. CURELL SURROL

Fig.1.

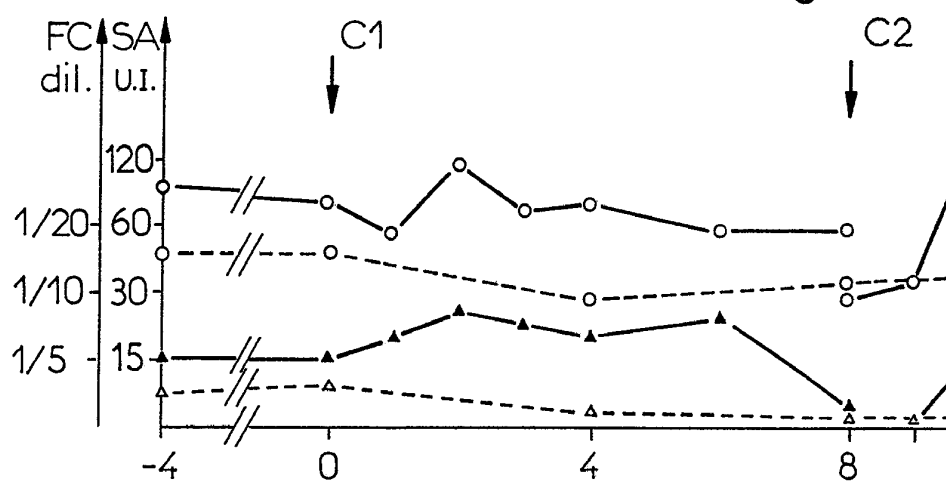


Fig.2.

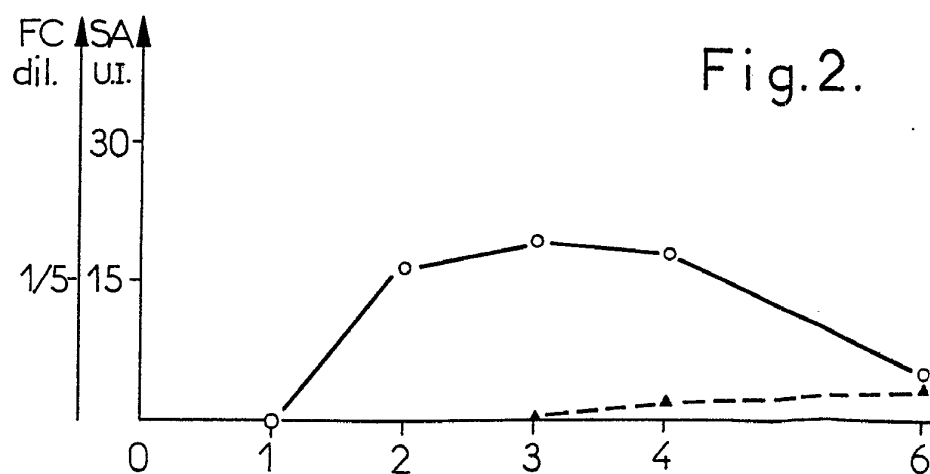


Fig.1.

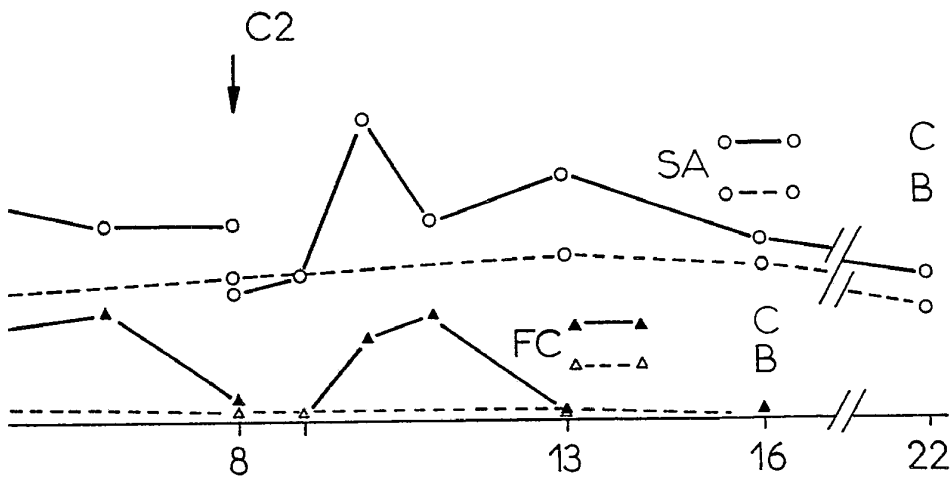
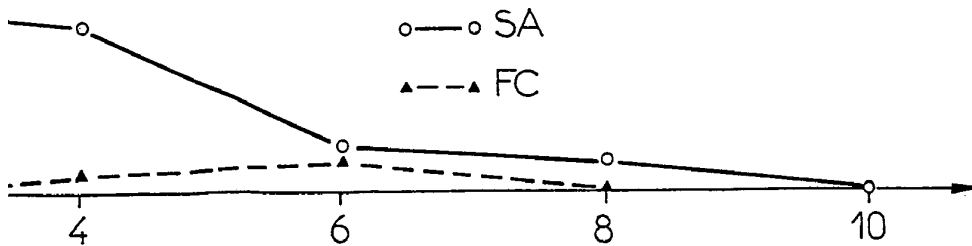


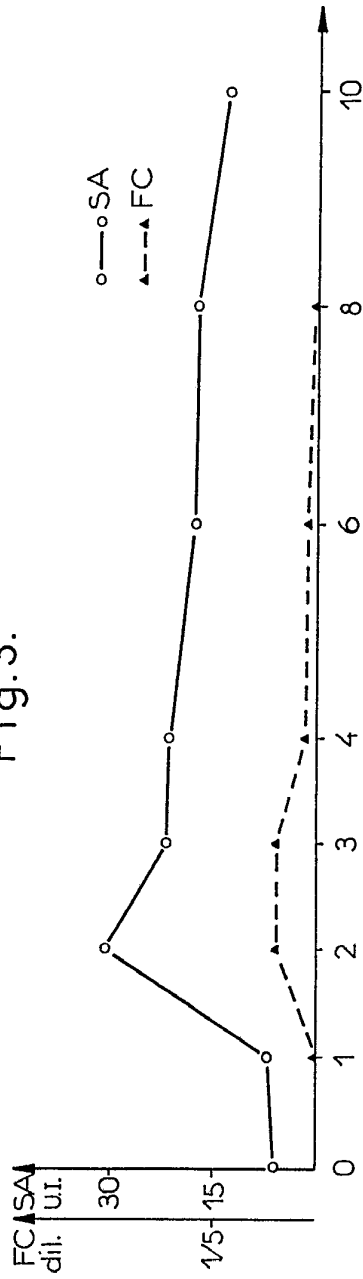
Fig.2.



MADRID, 27 NOV. 1976

P. A. M. CURELL SUÑOL

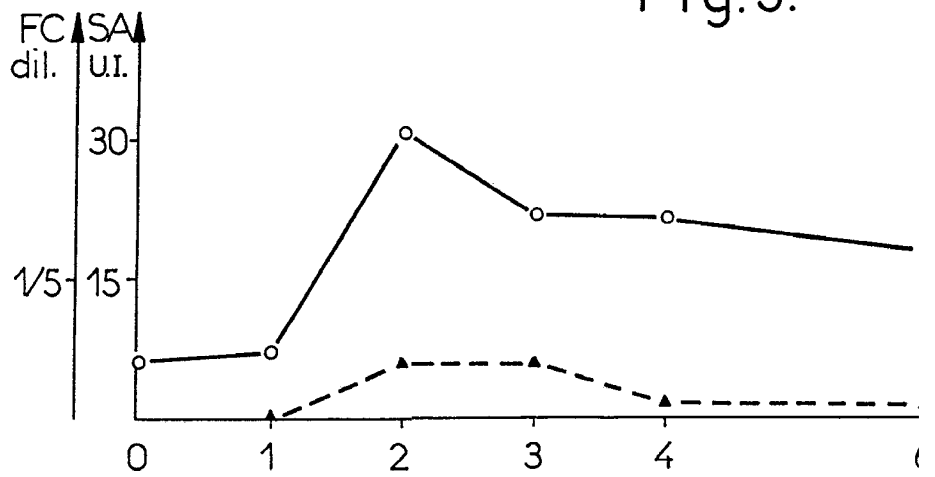
Fig.3.



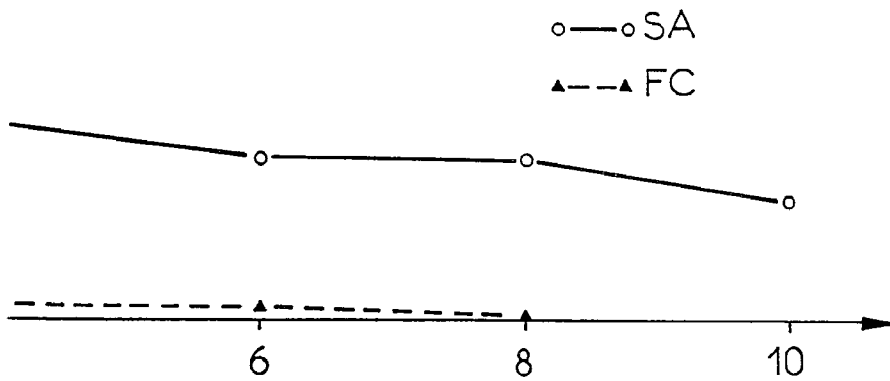
MADRID, 27 NOV. 1976

P. A. AL. CURELL SURRO

Fig.3.



ig.3.



MADRID, 27 NOV. 1976

P. A. AL. CURELL ~~SUBOL~~