

MINISTERIO DE INDUSTRIA Y ENERGIA

Registro de la Propiedad Industrial



ESPAÑA

Concedida al Registro de acuerdo con las leyes que figuran en la presente inscripción y según el contenido de la Memoria adjunta.

19 ES

11

21

22

NUMERO	466773 ¹ A1
FECHA DE PRESENCIA	- 8 FEB. 1978

PATENTE DE INVENCION

30 PRIORIDADES:		32 FECHA	33 PAIS
31 NUMERO			
77 03438		8.2.77	FRANCIA
77 01556		19.1.78	FRANCIA

47 FECHA DE PUBLICIDAD	51 CLASIFICACION INTERNACIONAL A61K	53 PATENTE DE LA QUE ES DIVISIONARIA
------------------------	--	--------------------------------------

54 TITULO DE LA INVENCION

PROCEDIMIENTO DE PREPARACION DE UN MEDICAMENTO PREVENTIVO DE LA SEPTICEMIA HEMORRAGICA VIRAL DE LA TRUCHA.

71 SOLICITANTE (S)

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

DOMICILIO DEL SOLICITANTE

149 rue de Grenelle, 75.007 PARIS, Francia

72 INVENTOR (ES)

Jean-Pierre GERARD, Ing., Pierre de KINKELIN

73 TITULAR (ES)

74 REPRESENTANTE

D. JOSE MIGUEL GOMEZ-ACEBO Y POMBO.

La presente invención se refiere a un procedimiento para la -
preparación de un producto de medicación veterinaria, útil para el trata-
miento preventivo de las truchas, contra la septicemia hemorrágica viral.

5 La septicemia hemorrágica viral, designada corrientemente con
la abreviatura SHV, es una virosis de la trucha que ocasiona mortalidades
importantes en los piscicultivos de Europa en particular. Se traduce por
perturbaciones locomotoras, circulatorias y pigmentarias, que preceden la
muerte. En particular se observa un nado en espiral, edemas, hemorragias
viscerales, exoftalmia, melanosis. Según la forma de la enfermedad, los
10 pescados pueden presentar únicamente algunos de estos síntomas. A menudo
se sospecha la presencia de la enfermedad en un piscicultivo desde el mo-
mento mismo que se observa la exoftalmia y la melanosis ó la decoloración
de las branquias, debido a la anemia que resulta de las hemorragias, y una
mortalidad muy importante.

15 Desde hace largo tiempo se conoce un virus responsable de es-
ta enfermedad. Se trata de un Rhabdovirus denominado, según los casos, -
virus de SHV ó virus de Egtved. Puede aislarse de los órganos extraídos
en pescados enfermos e identificado por sero-neutralización ó inmunofluo-
rescencia en cultivo celular. Ha sido aislado por primera vez en la tru-
cha Arc-en-Ciel, por JENSEN, en Dinamarca en 1.963, y su morfología fué
20 establecida por ZWILLENBERG (1.965); su identificación serológica se des-
cribe en particular por VESTERGAARD-JORGENSEN en Bull. Off. Int. Epiz.,
69 (7-8), p. 985-989 (1.968). Más recientemente, se ha puesto de manifiesto
que existe de hecho diferentes tipos de virus de SHV.

25 En la práctica, la lucha contra SHV plantea problemas difí-
ciles de resolver, puesto que al no haberse observado ninguna reacción
inmunitaria a la enfermedad contraída en piscicultivo, los piscicultores
no han podido recurrir hasta ahora a otra solución que a una profilaxis
sanitaria severa. Después de la desinfección, los piscicultivos deben -
30 ser repoblados con pescados indemnes y el piscicultor debe protegerse -

evitando cualquier introducción de otros pescados. Es fácil de comprender que estas exigencias se adaptan mal a las condiciones habituales de explotación de los piscicultivos. Además, impiden prácticamente las transferencias de ganado, para evitar la introducción de un sujeto portador del virus, mientras que incluso en estas condiciones, el piscicultor no está al cubierto de una recontaminación por el río.

Estas dificultades pueden resolverse merced a la presente invención que radica en la posibilidad de conferir a las truchas una resistencia adquirida al SHV, lo que permite considerar un tratamiento preventivo de los pescados, mucho más fácil de realizar en la práctica que las medidas sanitarias que hasta ahora constituían el único recurso contra esta enfermedad.

Conforme a la invención, un medicamento preventivo de la septicemia hemorrágica viral de la trucha contiene una vacuna constituida por una preparación de virus de SHV inactivado.

El medicamento ó vacuna según la invención se prepara por inactivación de virus de SHV producido en cultivo celular. El virus puede cultivarse en cualesquiera tipos de células de pescados que permitan su desarrollo, en condiciones que son por su parte clásicas. Estas condiciones pueden elegirse entre todas aquellas que habitualmente son reconocidas para los cultivos de células de pescados. Condiciones de cultivo particularmente adaptadas a los diferentes tipos de virus SHV dentro del marco de la invención, son las que han sido descritas en particular para el virus de Egtved por P. de Kinkelin y R. Sherrer en Ann. Rech. Vétér. (INRA), 1 (1), p. 17-30 (1.970).

Dentro del marco de la realización práctica de la invención se ha encontrado particularmente ventajoso operar el desarrollo del virus vivo en cultivos celulares de la raza EPC (Epithelium Papulosum Cyprini) Sin embargo, igualmente se pueden utilizar otras razas, por ejemplo las razas FHM (Fathead Minnow) y RTG2 (Rainbow Trout Gonad), que están dis-

ponibles comercialmente y se venden en particular en los Estados Unidos de America por Microbiological Associates (Ames, Ohio) y distribuidas en Francia por Flow Dynalab. Para las células de cultivo preferido, para la preparación de la vacuna según la invención, EPC es la abreviatura de Epithelium Papulosum Carpio, ó de Epithelium Papulosum Cyprini. Se trata de células de piel de carpa, y más precisamente de una raza epiteloide procedente de un tumor benigno de piel de carpa que ha sido aislada allá por los años 1.968-1.970 por el Profesor Fijan, en la Escuela Veterinaria de Zagreb, Yugoslavia y que ha sido mantenida desde 1.971 en los laboratorios de Ictiopatología del Instituto Nacional de la Recherche Agronomique (INRA), Francia, desde 1.971. Esta raza de células ha sido objeto de un depósito de cepa de microorganismo en la Collection Nationale de Cultivos de Microorganismos (CNM) en el Instituto Pasteur, calle del Doctor Roux nº 28, Paris XIV bajo el número I-039, El 10 de Enero de 1.978.

Como medio de cultivo, se puede utilizar el medio de Eagle, como se describe en el artículo de P. de Kinkelin y R. Scherrer ya citado. El medio de Eagle contiene, por mililitro: 100 unidades de penicilina, - 100 microgramos de estreptomocina, 50 microgramos de Kanamicina y 50 unidades de mycostatine. Dentro del marco de la invención se prefiere el medio de Stoker, que es una modificación de proporción doble en ácidos aminados y en vitaminas. Las condiciones de cultivo pueden ser las que se han descrito para la producción de virus de Egtved en el artículo evocado anteriormente. Sin embargo, para la eficacia de la vacuna preparada según la invención, se ha comprobado que es preferible, en unión con las células de la raza EPC, utilizar un medio mantenido a un pH comprendido entre 7,4 y 7,6 mediante un tampón que puede ser en particular bicarbonato de sodio, tris etc, incluso que el pH pueda también variar entre límites mayores, es decir entre 7 y 8. El medio de cultivo es adicionado de una sustancia nutritiva que puede ser en particular suero de embrión de vacuno, con una concentración del orden de 1 a 10 %. La temperatura es mantenida

dentro de la gama de temperaturas donde el virus se desarrolla fácilmente, es decir preferentemente a una temperatura comprendida entre + 10°C y + 20°C, y en particular del orden de 12°C a 15°C. El cultivo puede efectuarse en capas monocelulares aunque en suspensión.

5 El virus inoculado en el cultivo celular puede estar constituido por cualquier cepa viral del virus SHV, tal que pueda aislarse, de forma conocida, de órganos de trucha enfermos en particular el cerebro, por trituración y centrifugación. La dosis de inoculación es variable dentro de gamas muy amplias. En general, se fija a cualquier valor comprendido entre 10^3 y una unidad que forma zona (UFP) por célula. El título en UFP se considera aquí y en lo que sigue como que se mide por el método de las zonas tal como se describe por P. de Kinkelin y R. Scherrer en el artículo ya citado, pero conducido preferentemente en células EPC.

15 Según la dosis de inoculación utilizada, la recolecta del sobrenadante viral tiene lugar después de un espacio de tiempo más ó menos largo de desarrollo. Este espacio de tiempo se determina ventajosamente de modo que sea suficiente para que la destrucción de las células por el virus sea completa. A título de ejemplo, en una forma de realización práctica del procedimiento, el tiempo de desarrollo del virus puede variar de 20 30 horas a 3 días para una inoculación que varía de 1 a 10^3 unidades formando zona por célula. El virus puede ser recolectado por ejemplo, como se describe en el artículo anteriormente citado, por congelación a - 35°C y descongelación a la temperatura ordinaria y después centrifugación de la suspensión durante 10 minutos a 4.000 r.p.m. y centrifugación complementaria del sobrenadante durante 2 horas a 18.000 r.p.m. (40.000 g), tomando los residuos en medio de cultivo.

30 Conforme a la invención, la preparación viral constituida por el sobrenadante líquido recolectado del cultivo de virus SHV, después de una ó varias pasadas en cultivo celular, se somete a un tratamiento de inactivación propio para conducir a la inactivación completa del virus.

En la práctica, se prefiere utilizar una preparación realizada en un número de pasadas comprendido entre 2 y 5 aproximadamente, en cultivo celular de pescado, en particular de la raza EPC, siendo continuada cada pasada hasta la destrucción completa de las células. La preparación viral sometida a la inactivación presenta ventajosamente un título comprendido entre 10^4 y 10^9 UFP por mililitro, y preferentemente entre 0,5 y 5×10^8 UFP por mililitro en una forma de realización preferida del procedimiento de preparación de un medicamento preventivo según la invención, se realiza la inactivación de la preparación viral de virus de Egtved por medio de β -propiolactona. En condiciones de realización preferidas, la concentración de β -propiolactona puede variar entre 1 es a 1.000 y 1 es a 10.000 aproximadamente en peso con respecto al peso de la suspensión viral tratada. El tiempo de acción necesario para obtener la inactivación completa del virus es en general del orden de 10 horas a 5 horas, a temperaturas que varían de 10 a 40°C. A menudo, no es necesario sobrepasar de 1 a 3 días a una temperatura preferentemente del orden de 15 a 25°C. Puede asegurarse que la inactivación es completa, verificando por ejemplo la ausencia de efecto citopatógeno de la preparación inoculada en un cultivo celular de pescado.

La preparación inactivada así obtenida constituye un medicamento según la invención, eficaz como vacuna para inmunizar truchas contra SHV. Con esta forma, la vacuna presenta un título elevado, a menudo comprendido entre 10^4 y 10^9 UFP de virus inactivado por mililitro de preparación y en particular del orden de 0,3 a 5×10^8 UFP/ml en el caso preferido. Eventualmente puede congelarse a -20°C y adicionarse de estabilizantes para conservarse más fácilmente. Puede igualmente diluirse, en particular en agua, hasta cualquier concentración deseada para su utilización. De un modo general, puede ponerse bajo cualquier forma clásica en medicamentos veterinarios, ya sea en fluido ó en sólido, y el medicamento puede contener una suspensión viral inactivada en asociación con to-

dos los adyuvantes usuales.

Sin embargo, vacunas particularmente eficaces pueden obtenerse por una forma de realización preferida del procedimiento que consiste esencialmente en SHV inactivado. Consiste en hacer seguir la inactivación completa del virus por β -propiolactona mediante un tratamiento a base de formol.

En la fase de inactivación por β -propiolactona, se procede como se ha descrito anteriormente. Preferentemente se inacula una cepa virulenta de virus SHV a un cultivo celular de pescado, en particular de la raza EPC, eventualmente después de varias pasadas en dicho cultivo, se recoge del cultivo una preparación viral de título comprendido entre 10^6 y 10^9 y preferentemente entre $0,5$ y 5×10^8 UFP/ml (unidades que forman zona por mililitro), se añade también β -propiolactona en una proporción del orden de $0,01$ a $0,1$ % y preferentemente de $0,01$ a $0,04$ % en peso con respecto al peso de líquido viral, que se deja actuar durante un tiempo del orden de 10 horas a 5 días, a una temperatura comprendida entre 15 y 25°C , hasta la inactivación completa del virus. La preparación viral puede recogerse eventualmente más concentrada, purificada por centrifugación, y diluida al título deseado para el tratamiento de inactivación por β -propiolactona. La inoculación inicial se diluye preferentemente de modo a obtener 10^{-2} a 10^{-3} UFP por célula para evitar la presencia de interferona, pero igualmente se puede utilizar una inoculación de título más elevado, por ejemplo hasta 1 UFP por célula, previamente desprovisto de las impurezas del cultivo celular.

La inocuidad de la preparación inactivada se verifica ventajosamente por al menos dos pasadas celulares en cultivo celular sensible al virus. Aquí se utiliza en particular células de la raza EPC, en medio de Stoker, como en las otras operaciones. Operando la inactivación se ha precisado, se puede asegurar una inocuidad que corresponde a menos de 1 UFP por mililitro.

El tratamiento complementario con formol permite reforzar el poder de vacunación de la preparación inactivada. Sin embargo, basta una concentración de formol relativamente débil con respecto a la que sería necesario para inactivar el virus si no estuviese previamente inactivado. Así pues, se evita tener que proceder a operaciones de diálisis para eliminar el exceso de agente de inactivación del producto final. Preferentemente, el formol se añade en la preparación en una cantidad que corresponde a una concentración final inferior al 0,05 %, y preferentemente comprendida entre 0,01 y 0,03 % de formaldehído en la preparación, lo que corresponde sensiblemente a una concentración de 0,02 a 0,1 % de formol comercial al 30-40 % de formaldehído. Después de un espacio de tiempo de contacto que puede ser en particular del orden de 10 horas a 3 días, a una temperatura comprendida entre 15 y 25°C, la vacuna obtenida está presta para utilizarse, ó para congelarse y conservarse hasta su utilización, eventualmente en mezcla con cualquier excipiente usual.

La vacuna preparada mediante el procedimiento que acaba de definirse es muy eficaz en la inmunización de las truchas contra SHV. Se observa en general una diferencia de 30 % como mínimo entre los grados de mortalidad por SHV entre animales testigos no tratados y en animales vacunados, experimentados según el procedimiento de infección permanente por baño, por experiencias que simulan la contaminación natural.

Como ya se indicado, la invención se aplica a cualquier cepa de virus SHV. Esta generalidad engloba casos particulares preferidos indicados a continuación.

Según una primera variante del procedimiento, una vacuna según la invención puede prepararse a partir del virus de Egtved de la cepa danesa F₁, cuyas propiedades se han descrito en el artículo de Pierre de Kinkelin y R. Scherrer, Annales de Recherches Vétérinaires, 1.970, 1 (1) p. 17-30, ó a partir de la cepa INRA 07-71 que es un sinónimo, que presenta las mismas propiedades y que reacciona idénticamente al ensayo de

seroneutralización, y que ha sido objeto de un depósito de cepa n° i-040 a nombre de Instituto Nacional de la Recherche Agronomique (INRA) el 10 de Enero de 1.978, en la Collection Nationale de Cultivos de Microorganismos del Instituto Pasteur, calle del Doctor Roux n° 28, Paris XVe. - Estas cepas se designan como que pertenecen al serotipo I.

Según una segunda variante, el procedimiento descrito en la patente principal permite igualmente preparar una vacuna según la invención a partir del virus de Egtved del serotipo II que se ha definido bajo el nombre de cepa He por Vestergaard-Jorgensen y que ha sido objeto, bajo esta referencia de identificación, de un depósito de cepa n° i-041 en la Collection Nationale designada más arriba, a nombre del mismo depositante, el 10 de Enero de 1.978.

Según la tercera variante de la invención, el procedimiento permite asimismo preparar una vacuna a partir del virus de la cepa 23-75, que ha sido aislado en INRA en 1.977 por Pierre de Kinkelin y M. Le Berre, y descrito por estos autores en las Memorias de la Academia de las Ciencias de Paris, 284, serie D, páginas 101-104 y páginas 401-404, y que ha sido objeto de un depósito de cepa n° i-042 el 10 de Enero de 1.978 en la misma Collection Nationale a nombre de INRA.

La experimentación de los productos ó medicamentos obtenidos según la invención a partir de las diferentes cepas pone de manifiesto que se trata de hecho de verdaderas vacunas, capaces de conferir a las truchas a las que se administra una inmunidad activa, de larga duración, que reviste un interes práctico al que no se podría haber llegado con la protección rápida pero efímera que podía asegurarse mediante una interferona. Esta protección puede obtenerse sin incidencia nociva para la salud de las truchas, estando prácticamente desprovisto el medicamento de toxicidad frente a dosis activas para prevenirlas contra la enfermedad.

El tratamiento de las truchas puede efectuarse por cualquier método ya aplicado de forma clásica para administrar sustancias medica-

mentosas a pescados. Administraciones por dosis individuales, por vía intraperitoneal por ejemplo, pueden practicarse utilizando la preparación viral inactivada tal como se obtiene con el procedimiento de la invención, eventualmente después de la dilución, a dosis del orden por ejemplo de 10^6 a 10^7 UFP.

Sin embargo, se prefiere en general para este tipo de tratamiento, las aplicaciones colectivas en los piscicultivos. Los tratamientos se practican ventajosamente ya sea por pulverización del producto líquido eventualmente diluido en agua desinfectada, en pescados provisionalmente fuera del agua ó bien por dilución del producto activo en agua donde viven los pescados. Estos son entonces, preferentemente, sometidos a un tratamiento asociado para hacerlos más receptivos frente a substancias medicamentosas introducidas en su agua, es decir en particular a un choque osmótico, a una depresión, a una elevación de temperatura, ó a una combinación de estos métodos. De un modo general, el tratamiento puede aplicarse a pescados de todas las edades. La concentración de virus inactivado en agua de tratamiento es ventajosamente superior a 10^3 UFP/ml. Puede ser en particular del orden de 10^3 a 10^6 ó 10^7 UFP/ml.

Una forma de administración particularmente apropiada consiste en tratar alevinos ó truchitas de peso comprendido entre 0,1 y 10 gramos, preferentemente inferior a 5 gramos, y en particular comprendido entre 0,5 y 1 gramo, operando en particular sobre alevinos mantenidos en especies de cascarones al amparo de una contaminación por virus, menos de 2 meses después de la pollada. Una forma de administración preferida consiste en una inmersión de los pescados en un baño acuoso del medicamento, a una concentración equivalente a 10^3 a 10^7 UFP/ml de virus inactivado durante un tiempo de al menos 50 minutos, ventajosamente del orden de 1,5 a 24 horas, a una temperatura comprendida entre 8 y 15°C , y preferentemente entre 8 y 12°C .

Se procede además ventajosamente a un refuerzo, por administra

oión de una dosis sensiblemente análoga, después de un espacio de tiempo del orden de 1 a 6 semanas después de la vacunación inicial, y preferentemente 2 a 4 semanas. Eventualmente, se puede efectuar cada administración a los pescados, para la vacunación inicial, y para las vacunas de refuerzo, después de haberles hecho sufrir un choque osmótico, sumergiéndolos en un baño de sal natural: inmediatamente después del choque osmótico, se mantienen los pescados en un baño que contiene la preparación viral inactivada, diluída a una concentración preferentemente comprendida entre 10^3 y 10^5 UFP por mililitro de agua del baño, durante un espacio de tiempo del orden de 50 minutos a 3 horas, a una temperatura de baño que puede ser la temperatura usual de los cascarones, del orden de 8-10°C, pero que también puede ser ligeramente superior, del orden de 10 a 15°C.

Por lo demás, la inmunización de las truchas contra SHV se efectúa ventajosamente con ayuda de vacunas mixtas, constituídas por una mezcla de al menos dos vacunas preparadas según la invención utilizando cepas de virus SHV de serotipos diferentes, por ejemplo una cepa de virus SHV de serotipo I y una cepa de virus 23-75.

Para ilustrar la invención de forma más detallada, se hará referencia ahora a ejemplos de realización particulares. Diversas características de la invención podrán ponerse de manifiesto durante la descripción que sigue de estos ejemplos que se refieren en particular al procedimiento de preparación de una vacuna según la invención y a las condiciones de su aplicación en el tratamiento preventivo de las truchas contra la septicemia hemorrágica viral. Sin embargo debe quedar bien entendido que estos ejemplos no son en modo alguno limitativos de la invención.

EJEMPLO I

El medicamento se prepara a partir de virus vivo aislado de forma clásica a partir de un triturado celular extraído de los pescados que han contraído la enfermedad ó en sujetos sanos portadores del virus. En el caso descrito, se utiliza una cepa de virus de Egtved de serotipo I

(virus F1) en cultivo celular de pescado de la raza EPC (Epithelium Papillosum Cyprini). La cepa es utilizada en su tercer paso en cultivo sin capa monocelular, siendo proseguido cada paso hasta el efecto citopatógeno completo (destrucción total de las células). La inoculación es efectuada con pequeña multiplicidad de infección, es decir más particularmente aproximadamente $2 \cdot 10^{-3}$ unidades que forman zona (UFP) por célula, utilizando 20 ml de virus diluido a $7 \cdot 10^4$ UFP/ml para un conjunto de $70 \cdot 10^6$ células. El cultivo es continuado a 14°C en medio de Stoker (medio de Eagle modificado), tamponado a un pH de 7,6 por tampón tris a 0,16 M y adicionado de 2% de suero de embriones de vacuno. Después de 3 días decultivo, el conjunto celular está completamente destruido. Se recoge entonces el sobrenadante infeccioso.

Este sobrenadante líquido de la tercera pasada se recoge y se clarifica por centrifugación durante 10 minutos a 4.000 g. El titulado de la preparación se efectúa, antes de la inactivación, por el método de las unidades que forman zona (UFP) ya mencionadas, tal como se describe en el artículo de P. Kinkelin y R. Scherrer citado, pero sustituyendo la raza FHM por la raza EPC. Se pone de manifiesto un título de $4 \cdot 10^8$ UFP por mililitro de líquido. Más precisamente, para este titulado, cajas de Petri de 8 cm^2 de superficie, que contienen un cultivo confluyente de células EPC de 24 horas, es decir 4,5 millones de células, en 2 ml de medio, se infectan con 0,1 ml de una dilución de virus a razón de 3 cajas por dilución. Después de una hora de absorción a una temperatura de 14 a 20°C , durante la cual las cajas son agitadas 5 ó 6 veces, el medio de cultivo tamponado a un pH de 7,6 se cuele sobre las células a la temperatura de 30°C a razón de 2 ml por caja. Al cabo de 2,5 a 3 días, un ml de rojo neutro a 0,05 % en solución de Earle a razón de 0,5 % de agarosa, se cuele sobre la primera capa de medio, cuatro horas antes de la lectura. El tercer día el diámetro de las zonas es del orden del milímetro.

La preparación viral es sometida a un tratamiento de inactiva

ción del virus. Este se efectúa por adición de β -propiolactona a la concentración de 1/6.000 en peso con respecto a la preparación viral. La mezcla se mantiene a + 20°C bajo agitación permanente. Después de tres días de acción de la β -propiolactona, la inactivación es completa. El excedente de agente inactivante se destruye por hidrólisis, sin otra intervención.

El producto puede utilizarse como medicamento veterinario preventivo, directamente bajo esta forma, ó ser liofilizado para a continuación ser reconstituido, en el momento del uso, por disolución en un diluyente inerte tal como agua destilada.

La inocuidad del producto es verificada. Un primer control consiste en asegurarse de la inactivación completa del virus. A este efecto, una muestra de preparación viral inactivada es cultivada en un conjunto monocelular de pescado. No se ha comprobado ningún efecto citopatógeno.

De otro lado, se inyecta la preparación por vía intraperitoneal a truchas arc-en-ciel aparentemente indemnes, a la dosis de 0,2 cm³ por pescado de 10 gramos. Esta dosis es ampliamente superior a las dosis suficientes para proteger los pescados. Sin embargo, se tolera perfectamente. A título comparativo, en un lote de truchas testigos a las que se inyecta virus vivo, se comprueba una mortalidad del 80 % diez días después de la inyección, mientras que en el mismo espacio de tiempo la inyección de la preparación inactivada a otro lote equivalente de truchas no ocasiona ningún fallecimiento por SHV.

En una primera experiencia de tratamiento preventivo de truchas por medio de la preparación inactivada del ejemplo I, 40.000 truchitas de 3 gramos extraídas de una cuenca de piscicultura no infectado de SHV se sumergen por lotes sucesivos en un baño de sal de mar natural a razón de 53 gl, durante 2 minutos. Después de este choque osmótico, se introducen en un baño de tratamiento previamente preparado por dilución de la preparación viral inactivada, en una cantidad tal que la concentración en el baño corres

ponda a un título de 1.500 unidades UFP por mililitro. Una difusión de oxígeno es asegurada en este baño.

Las truchitas se mantienen en este baño durante 1 hora y después se reintroducen en una cuenca de piscicultivo de alimentación natural donde la temperatura era de 14°C. Al cabo de 4 meses el número de pescados muertos es inferior a 1.200, lo que corresponde una mortalidad normal del 3 %. En un lote testigo de 20.000 truchitas no tratadas, el número de muertos al cabo de 4 meses es de 15.000. La diferencia se explica por la sensibilidad de los pescados no tratados a una reinfección natural por SHV.

En otra experiencia, se trata alevinos de 0,1 gramo sumergidos 1 hora en un baño de agua a 10°C que contiene la preparación viral inactivada a la concentración de 40.000 UFP/ml obtenida por adición de 10 ml de preparación en 100 l de agua. El choque osmótico se realiza previamente como se ha dicho anteriormente. Los alevinos se mantienen a continuación durante un mes en medio indemne de SHV y después se introducen en piscicultivos no aislados. En 18 lotes de 33.000 alevinos cada uno, la mortalidad después de un mes y medio es del 4 % para los pescados tratados, contra el 70 % para los pescados testigos no tratados.

En una tercera experiencia, 40.000 alevinos son tratados como anteriormente utilizando un baño que contiene 20 ml de la preparación a $4 \cdot 10^8$ UFP/ml para 100 l de agua. A continuación se alimentan a un piscicultivo de alimentación no desinfectada. Una contaminación accidental por SHV tres meses después trae consigo una muerte rápida de todos los pescados no tratados, mientras que la mortalidad permanece normal al 4 % en los animales tratados.

EJEMPLO III

Se utiliza la cepa He ya mencionada, tal como depositada con el nº 1-041 en el Instituto Pasteur, que se inocular a un cultivo celular de la raza EPC (Epithelium Papulosum Cyprini). Esta raza de células de -

piel de carpa ha sido objeto del depósito n^o i-039 el 10 de Enero de -
1.978 en la Collection Nationale en el Instituto Pasteur, a nombre de -
INRA. La cepa virulenta está en su quinceava pasada en cultivo celular
de esta raza. La inoculación es efectuada con pequeña multiplicidad de -
5 infección, es decir más particularmente aproximadamente 2.10^{-3} unidades
que forman zona (UFP) por célula, utilizando 20 ml de virus diluido en
 7.10^3 UFP/ml para un conjunto de 70.10^6 células. El cultivo es continuado
a 14°C en medio de Stoker (medio de Eagle modificado, a una proporción -
doble en ácidos aminados y en vitaminas), tamponado a un pH de 7,6 median
10 te tampón tris a 0,16 M y adicionado de 2 % de suero de embrión de vacuno,
durante 3 días, hasta la destrucción completa de las células.

El sobrenadante líquido es recogido y clarificado por centri-
fugación durante 10 minutos a 4.000 gramos. El titulado de la preparación
se efectúa por el método de las zonas (UFP) mencionado, tal como se des-
15 cribe en el artículo de P. de Kinkelin y R. Scherrer citado, pero susti-
tuyendo la raza FHM por la raza EPC como mencionado en el ejemplo I. Se
pone de manifiesto un título de 2.10^8 UFP por mililitro de líquido.

Se añade entonces al sobrenadante viral β -propiolactona a la
concentración final de 1/6.000 en peso en la suspensión viral. La mezcla
20 se mantiene a + 20°C bajo agitación permanente. Después de 3 días de ac-
ción de la β -propiolactona, la inactivación es completa. El excedente de
agente inactivado se destruye por hidrólisis, sin ninguna otra interven-
ción.

En 25 l de preparación viral inactivada así obtenida, se ex-
trae una muestra de 10 ml que se utiliza para inocular 10 cajas de 75 cm²
de cultivo celular de la raza EPC con, cada una, 1 ml de la muestra. Des-
pués de 8 días, comprobando la ausencia de efecto citopatógeno, se opera
un paso a ciegas a partir de cada caja. No se produce destrucción alguna
de célula por la preparación. El medio de prueba es el medio de Stoker a
30 un pH de 7,6, adicionado de 2 % de suero de embrión de vacuno, a la tempa

ratura de 14°C.

Mientras se verifica así en una muestra la inocuidad de la -
preparación de virus inactivado, se añade a ésta, tras la adición de la
 β -propiolactona, formol a la concentración final de 1/2.000 (0,02 % de
5 formaldehído en la preparación obtenida). Se deja actuar durante 3 días
y después el vacuno así obtenido es congelado.

EJEMPLO IV

Se utiliza virus de SHV tipo I, producido a su cuarta pasada
sobre cultivo celular EPC.

10 Se utiliza más precisamente la cepa 07-71 tal como deposita-
da bajo el número i-040 en el Instituto Pasteur, que es homóloga de la
cepa danesa F₁, tanto en el ensayo de identificación por seroneutraliza-
ción como por sus propiedades.

15 Se prepara una vacuna anti-SHV operando como en el ejemplo
III.

Los ensayos de identificación serológica son efectuados de -
modo clásico. Los sueros son preparados por inmunización del conejo con
el virus concentrado por Carbowax administrado por inyecciones repetidas
de 10³ UFP, en primer lugar por vía intramuscular con adyuvante de Freund
20 y 2 semanas después por vía intravenosa. Los virus de referencia son di-
luídos, filtrados a 0,45 micrones, titulados y después congelados en ni-
trógeno. Las cepas a identificar son tratadas asimismo, a excepción de la
congelación. La seroneutralización es efectuada por la técnica de reduc-
ción del 50 % del número de las zonas (para la que se puede hacer referen-
25 cia al artículo de CASALS J. Methods of virology, Maramorosch et Koprows-
ky, Academic Press, New York, 1.967, 3), comparando el título neutralizan-
te de un suero por su virus homólogo (virus de referencia) con el que -
tiene como virus a identificar.

EJEMPLO V

30 El rhabdovirus 23-75 ha sido aislado en ENRA de la trucha Fa-

rio (Brown Trout) y encontrado patógeno tanto para la trucha Arc-en-ciel (Rainbow Trout) como para la trucha Fario. La cepa ha sido depositada en su quinta pasada en cultivo celular EPC en el Instituto Pasteur (nº i-039 ya citado).

5 In vitro, el virus 23-75 se multiplica como el virus de Egtved de serotipo I (como la cepa 07-71). Sus propiedades han sido descritas en De Kinkelin P. y Le Berre M. 1.977 por "Aislamiento de un rhabdovirus patógeno de la trucha Fario (*Salmo trutta*)", C.R. Acad. Sci. Paris, 284, - serie D, 101-104, y en De Kinkelin P., Baudony A.M., Le Berre M. 1.977 -
10 "Reacción de la trucha Fario (*Salmo trutta* L 1.736) y Arc-en-ciel (*Salmo gairdner*, Richardson 1.836), para la infección por un nuevo rhabdovirus", C.R. Acad. Sci. Paris, 284, serie D, 401-404.

Una inoculación virulenta de esta cepa, deluída con multiplicidad de infección de 10^{-3} UFP por célula, se inocula a un cultivo de EPC
15 de 24 horas de edad. Aquí como en los otros ejemplos y la patente principal la multiplicidad de infección se mide como se ha descrito en los anales de Recherches Vétérinaires (INRA), 1.970, 1, p, 19, en cultivo sobre células de la raza EPC.

Después de un espacio de tiempo de absorción de 2 horas a -
20 18°C, se añade un medio de cultivo: medio de Stoker suplementado por 2 % de suero de embrión de vacuno. La incubación se continúa entonces a 14°C, durante 3 horas, tiempo al cabo del cual la destrucción del conjunto de - células es normalmente total.

Después de la centrifugación a 3.000 g durante 15 minutos,
25 el sobrenadante infeccioso se recoge, llevado a una temperatura comprendida entre 18°C y 22°C y se adiciona de β -propiolactona a una dilución final comprendida entre 1 es a 4.000 y 1 es a 6.000.

Después de la agitación durante 2 a 3 horas, se deja la inactivación que continúe durante 2 días a la temperatura anterior.

30 Después de este plazo de tiempo, se extraen 2 ml por litro de

la preparación que servirán para un control de la inocuidad efectuado el día siguiente de esta extracción, es decir después de 3 días de inactivación.

El formol a la dilución final comprendida entre 1 es a 1.000 y 1 es a 3.000 se añade a la suspensión inmediatamente después de que la extracción para el control de inocuidad se haya efectuado.

Después de 24 horas de tratamiento por formol, la preparación de vacuna se reparte por volúmenes de 100 ml y se congela a -20°C hasta el resultado de las pruebas de inocuidad. A continuación puede utilizarse.

Las pruebas de inocuidad consisten en inocular frascos de 25 cm^2 de cultivo celular de EPC de 24 horas de edad a razón de 0,5 ml de preparación de vacuna por frasco, es decir 4 frascos por litro. La extracción de vacuna utilizada no contiene formol, puesto que éste destruiría las células y haría imposible la detección de la presencia de virus virulento.

Sí al cabo de una semana no ha aparecido ningún efecto citopatógeno (multiplicidad de infección inferior a 1 UFP por ml), se procede a una nueva inoculación a partir de los sobrenadantes de la inoculación anterior, y se verifica la ausencia de efecto citopatógeno en esta segunda pasada.

EJEMPLO VI

La vacuna preparada conforme al ejemplo IV es administrada a alevinos de 0,6g. por inyección intraperitoneal después de anestesia, a dosis individuales de $4 \cdot 10^6$ UFP de virus inactivado.

Después de 75 días, la prueba de la eficacia de la protección se efectúa por comparación de lotes de pescados vacunados con testigos no vacunados, durante un contacto prolongado de los pescados (3 horas) con una suspensión acuosa de virus que titula entre 10^4 y 10^5 UFP/ml. Los animales son ó bien colocados en jaulas flotantes puestas en mismo receptáculo ó bien en acuarios instalados en serie, estando los testigos aguas arri-

ba. De este modo, una contaminación permanente por los testigos es asegurada, permitiendo una simulación de las condiciones naturales.

Se comprueba una mortalidad del 10 % únicamente entre los pescados vacunados, contra un 60 % en los testigos.

5. En otra experiencia, la misma vacuna es administrada a alevinos de 0,3 g que se sumergen 2 minutos en una solución acuosa de NaCl al 5,35 % y después, se mantienen durante 3 horas en un baño a 10°C que contiene 10^6 UFP/ml de virus inactivado. Un refuerzo se efectúa en las mismas condiciones a los 40 días. A los 75 días, el control de la eficacia de protección se efectúa como anteriormente. La mortalidad es del 14 % en los pescados vacunados, contra el 62 % en los testigos.

EJEMPLO VII

En medio indemne de SHV se administra la vacuna del ejemplo IV (preparada a partir de la cepa 07-71 operando la operación como en el ejemplo III) a 30.000 alevinos de 0,6 g por inmersión 2 minutos en una solución de NaCl a razón de 53 g/l y después 1,5 horas en un baño vacunante a razón de 10^5 UFP/ml de virus inactivado. La cantidad de baño es de 2,5 l para un 1 kg de pescado. Se mantiene allí constantemente una difusión de oxígeno. La temperatura es de 10°C. El pH es de 7,4 inicialmente y desciende hasta 6,9 al final del tratamiento.

20 Les pescados son dejados un mes en medio indemne, sometidos a un refuerzo de vacunación y después dejados de nuevo dos meses en medio indemne.

25 Después de este espacio de tiempo, se colocan en piscicultivo en medio contaminado por SHV. La mortalidad determinada dos meses después es del 5 % en los pescados vacunados, contra el 66 % de muertos en los testigos no vacunados.

EJEMPLO VIII

30 Se utiliza para vacunar truchas, una vacuna mixta de virus SHV cepa 07-71 y de virus 23-75 constituida por una mezcla en partes iguales

de las vacunas preparadas conforme a los ejemplos IV y V, diluída a una concentración que corresponde a un título de $2 \cdot 10^8$ UFP/ml de cada cepa.

La vacuna es administrada por dosis individuales de 0,1 ml en inyecciones intraperitoneales a alevinos de 0,5 g con refuerzo 3 semanas después de la primera dosis. Después de 76 días los pescados son colocados en medio contaminado ya sea por virus SHV de serotipo I (cepa 07-71) F₁, ó bien por virus 23-75 (medio infectado a razón de 10^5 UFP/ml), al mismo tiempo que testigos no vacunados.

Los muertos por SHV se reparten de la siguiente manera, un mes después de la infección (106 días después de la primera vacunación):

Infección por SHV I:

Testigos : 18 muertos de 30 pescados;

Vacunados : 3 muertos de 23 pescados;

Infección por virus 23:

Testigos : 37 muertos de 44 pescados;

Vacunados : 3 muertos de 23 pescados.

Estos resultados demuestran la eficacia de la vacuna mixta - para inmunizar las truchas contra los dos virus de la asociación.

EJEMPLO IX

Este ejemplo se refiere al empleo de una vacuna preparada conforme al ejemplo IV anterior.

Lotes de 80 truchitas cada uno de 6 g de peso se tratan como sigue, después de 3 días de edad.

Lote 1 : Testigo - choque osmótico por inmersión en un baño a 53 g/l de cloruro de sodio durante 2 minutos. Temperatura del agua: 11,5°C
pH : 7,1.

Lote 2 y 3 : Anestesia de los pescados por adición a su agua del producto de la firma Sandoz, designado comercialmente MS 222 a la dosis de 0,2 g para 4 litros de agua. Administración de la vacuna por vía intraperitoneal a la dosis individual de 0,1 ml equivalente

te a 1 a 2.10^7 UFP de virus inactivado. Inmersión de los animales tratados en agua fresca a temperatura de $11,5^{\circ}\text{C}$; pH: 7,1.

5 Lote 4 : Administración de la vacuna por inmersión de los pescados durante una hora 30 minutos en un baño de 1.200 ml de agua adicionada de la vacuna a una dosis equivalente a 3 a 6.10^5 UFP de virus inactivado por mililitro de agua. Temperatura del baño que pasa de 10°C a 8°C y pH que pasa de 7,1 a 7,8 entre el comienzo y el final de la experiencia.

10 Lote 5: Choque osmótico por inmersión en un baño a 53 g/l de cloruro de sodio durante 2 minutos. Después administración de la vacuna en las mismas condiciones que para el lote 4. Los pescados se sumergen en 3 veces su peso de agua.

15 Después de un espacio de tiempo de 2 semanas, los diferentes lotes son sometidos de nuevo cada uno al mismo tratamiento, que constituye para los lotes 2 a 5 un refuerzo de vacunación.

20 Veinte días después, los diferentes lotes son sometidos a una prueba de resistencia, que consiste en una inmersión durante 3 horas en un baño que contiene virus virulento de la cepa 07-71 a la dosis de 10^5 UFP/ml. Los testigos del lote 1 se colocan en el circuito de agua que alimenta en paralelo los baños de los lotes 2 a 5, lo que garantiza que los pescados vacunados se expongan al menos tanto como los testigos a los riesgos de contaminación.

25 La mortalidad en cada lote se determina antes y después de esta infección. Cualquier mortalidad sospechada antes de la infección es objeto de un diagnóstico virológico. La causa de las muertes después de la infección experimental es verificada confirmando la presencia del virus en los órganos de los pescados.

30 Los resultados confirman la eficacia de la vacunación: el grado de mortalidad en los pescados vacunados, un más después de la infección

es siempre inferior al menos en el 30 % al grado de mortalidad observado en los testigos.

Naturalmente la invención no se limita en modo alguno a las condiciones particulares que han sido descritas dentro del marco de los ejemplos particulares de realización.

Descrita suficientemente la naturaleza del invento, así como la manera de realizarlo en la práctica, debe hacerse constar que las disposiciones anteriormente indicadas son susceptibles de modificaciones de detalle en cuanto no alteren su principio fundamental.

10

15

20

25

30

REIVINDICACIONES

1.- Procedimiento de preparación de un medicamento preventivo de la septicemia hemorrágica viral de la trucha, caracterizado porque se hace sufrir a virus SHV en cultivo celular de pescado, un tratamiento de inactivación hasta la inactivación completa del virus, por contacto con β -propiolactona.

2.- Procedimiento según la reivindicación 1, caracterizado porque el virus de partida es producido en cultivo celular de la raza EPC a un título comprendido entre 10^4 y 10^9 UFP/ml.

3.- Procedimiento según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque se somete la preparación inactivada a un tratamiento complementario por formol a una concentración final inferior a 0,05 % de formaldehído en la preparación.

4.- Procedimiento según la reivindicación 3, caracterizado porque se extrae una muestra de la preparación inactivada por β -propiolactona y se verifica su inocuidad en un cultivo celular de células de pescado por al menos dos pasadas.

5.- Procedimiento según una de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque se parte de virus de Egtved producido en cultivo celular de pescado de la raza EPC, en un medio nutritivo a base de medio de Stoker tamponado tris a un pH del orden de 7,4 a 7,6 y a una temperatura comprendida entre 10 y 20°C, se recoge el sobrenadante viral a un título del orden de $3 \cdot 10^7$ a $5 \cdot 10^8$ UFP/ml, y se trata por contacto por β -propiolactona a una concentración comprendida entre 1/1.000 y 1/10.000 del peso de la suspensión viral, a una temperatura comprendida entre 15y 25°C, durante un espacio de tiempo suficiente para asegurar la inactivación completa del virus.

6.- Procedimiento según las reivindicaciones 3 ó 4, caracterizado porque una preparación viral constituida por el sobrenadante líquido de un cultivo de virus SHV en cultivo celular de pescado, de título -

comprendido entre 10^7 y 10^9 UFP/ml, y preferentemente entre 0,5 y $5 \cdot 10^8$ UFP/ml, se trata por contacto con β -propiolactona, a una concentración comprendida entre 0,01 y 0,1 %, y preferentemente entre 0,01 y 0,04 % del peso de la suspensión viral, a una temperatura preferentemente comprendida entre 15 y 25°C, durante un espacio de tiempo comprendido entre 10 horas y 5 días, porque se verifica la unocuidad de la preparación inactivada en una muestra que se inocula a un cultivo celular, con al menos dos pasadas, y después se somete la preparación inactivada a un tratamiento complementario por formol, a una concentración final comprendida entre 0,01 y 0,03 % de formaldehído en la preparación, durante un espacio de tiempo del orden de 10 horas a 3 días, pudiendo a continuación congelarse la vacuna así obtenida.

7.- Procedimiento según la reivindicación 6, caracterizado porque se utiliza virus cultivado en células de la raza EPC, tal como depositada en el Instituto Pasteur el 10 de Enero de 1.978 bajo el número i-039.

8.- Procedimiento según la reivindicación 6 ó 7, caracterizado porque el virus es virus de Egtved de serotipo I ó II.

9.- Procedimiento según las reivindicaciones 6 ó 7, caracterizado porque el virus se elige entre una cepa 07-71 tal como depositada el 10 de Enero de 1.978 en el Instituto Pasteur, bajo el n° i-040, y una cepa de virus 23-75 tal como la que ha sido depositada el 10 de Enero de 1.978 en el Instituto Pasteur bajo el n° i-042.

10.- Procedimiento según las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque cuando se trata de inmunizar truchas contra SHV, se someten truchitas de peso comprendido entre 0,1 y 10 g a una primera vacunación por administración de virus inactivado obtenido como anteriormente, seguida de un refuerzo después de un espacio de tiempo del orden de 1 a 6 semanas, y preferentemente del orden de 2 a 4 semanas.

11.- Procedimiento según la reivindicación 10, caracterizado

5 porque el tratamiento se efectúa por inmersión de los pescados en un baño acuoso del medicamento en concentración equivalente a 10^3 a 10^7 UFP/ml de virus inactivado durante un espacio de tiempo de al menos 50 minutos, ventajosamente del orden de 1,5 a 24 horas, a una temperatura preferente mente comprendida entre 8 y 12°C .

12.- Procedimiento según la reivindicación 10 ú 11, caracterizado porque se administra a las truchas una mezcla de al menos dos vacunas, obtenidas a partir de cepas de serotipos diferentes, en particular de virus de Egtved de serotipos I y de virus 23-75.

10 13.- Procedimiento de preparación de un medicamento preventivo de la septicemia hemorrágica viral de la trucha; tal y como queda sustancialmente descrito en la presente Memoria.

Esta Memoria consta de 24 hojas escritas a máquina por una sola cara.

15 Madrid,

- 8 FEB. 1978

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE -

AGRONOMIQUE.

J. M. GOMEZ ACEBO Y PONS
P. p. Firmado: J. Suarez Diaz

20

25

30