



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 358 798**

51 Int. Cl.:
A61K 39/125 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04720404 .5**
96 Fecha de presentación : **12.03.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1606391**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **21.12.2005**

54 Título: **Calicivirus felino sistémico virulento.**

30 Prioridad: **14.03.2003 US 388837**
30.01.2004 US 769531

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
13.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
13.05.2011

73 Titular/es: **Regents of the University of California**
Office of Technologie Transfer
111 Franklin Street
Oakland, California 94607-5200, US

72 Inventor/es: **Foley, Janet, E.;**
Hurley, Kate;
Pedersen, Niels, C. y
Poland, Amy

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 358 798 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Calicivirus felino sistémico virulento

Antecedentes de la invención

5 El calicivirus felino (FCV) es un patógeno común encontrado en gatos. Este virus se detecta a menudo en múltiples ambientes gatunos tales como refugios y gaterías. La infección con calicivirus felino (FCV) puede causar una diversidad de manifestaciones y síntomas incluyendo fiebre, signos respiratorios superiores, enfermedad oral aguda o crónica, cojera y ocasionalmente neumonía. La vacunación con un virus vivo atenuado contra FCV se practica ampliamente y proporciona protección moderada contra enfermedad aguda causada por muchas, pero no todas, las cepas de calicivirus. Los gatos en poblaciones endémicas de FCV pueden propagar FCV en descarga ocular o 10 nasal, saliva y heces sin mostrar signos clínicos de infección. Tales gatos portadores pueden servir como una fuente de infección para otros. En el pasado, la infección caliciviral felina no era usualmente mortal, sin embargo, cuando la muerte ocurre se debe más frecuentemente a neumonía o infección respiratoria superior grave en gatitos jóvenes.

15 La infección y la enfermedad por FCV ocurren en formas aguda y crónica (Studdert, M.J. (1978) Arch. Viral., 58: 157-191; Reubel y col., (1992) Vet. Clin. No. Am. Small Anim. Pract., 22: 1347-1360), en las que los signos que manifiestan enfermedad aguda dependen de la vía (*por ejemplo*, oral, aerosol) y la cepa del virus. La enfermedad puede diferir en gravedad, con cepas más virulentas que causan fiebre; depresión; disnea; neumonía; y vesículas y úlceras de la lengua, el paladar óseo y las narinas. Es menos probable que las cepas de menor virulencia afecten a los pulmones, aunque otros signos son similares. La mayoría de los portadores de FCV son asintomáticos, sin embargo, una proporción pequeña desarrollará un síndrome distinto conocido como estomatitis plasmocítica o 20 linfocítica crónica o estomatitis ulceroproliferativa crónica (Reubel y col. (1992) *supra*). Esta enfermedad crónica oral es progresiva y difícil de tratar y es quizás la manifestación clínica más prevalente de FCV según conocimiento. Aunque las cepas reconocidas de FCV no se han asociado con mortalidad aguda significativa, el genoma de calicivirus se conoce por ser altamente mutable (Johnson, R.P., (1992) Can. J. Vet. Res., 56: 326-330). Así, las cepas más altamente virulentas pueden surgir en cualquier momento.

Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una vacuna y a procedimientos de inmunización contra una infección viral causada por un calicivirus felino sistémico virulento, designado VS-FCV, una forma novedosa, atípica e inusualmente virulenta de un calicivirus que da como resultado un síndrome febril hemorrágico altamente contagioso y mortal.

30 En un aspecto de la invención, se proporciona una composición inmunogénica para usar en inmunización contra una infección viral causada por un calicivirus sistémico virulento (VS-FCV), en la que dicha composición inmunogénica comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de un VS-FCV atenuado seleccionado de FCV-Kaos y FCV-Ari y un vehículo fisiológicamente adecuado y en el que el VS-FCV no atenuado causa un síndrome febril altamente contagioso en gatos con síntomas seleccionados de fiebre alta, edema, ulceración, pérdida del pelo, descarga nasal 35 y ocular, anorexia, depresión y muerte y en el que el tratamiento de dichos gatos con una dosis inmunológicamente efectiva de FCV-F9 no logra sustancialmente ninguna protección contra infección con VS-FCV.

40 También está descrito un calicivirus sistémico virulento aislado (VS-FCV) en el que el virus causa un síndrome de fiebre hemorrágica altamente contagioso en gatos con síntomas seleccionados del grupo constituido por fiebre alta, edema, ulceración, pérdida de pelo, descarga nasal y ocular, anorexia, depresión y muerte, en el que el tratamiento de dichos gatos con antisuero contra FCV-F9 no logra sustancialmente ninguna protección contra infección con VS-FCV. La presente revelación también incluye un calicivirus sistémico virulento aislado (VS-FCV), en el que el virus comprende una proteína de cápside que incluye un residuo de aminoácido seleccionado del grupo constituido por 45 lisina (K) en la posición aminoacídica 448; ácido glutámico (E) en posición aminoacídica 452; lisina (K) en la posición aminoacídica 581; y ácido aspártico (D) en la posición aminoacídica 581. Opcionalmente, la proteína de la cápside tiene asparragina (N) en la posición aminoacídica 394, en la que la asparragina (N) incluye un sitio de glicosilación. Ejemplos del VS-FCV incluyen, pero no se limitan a, cepas tales como FCV-Kaos, FCV-Ari y FCV-Bellingham.

50 La presente revelación también incluye un calicivirus sistémico virulento aislado (VS-FCV) que comprende una proteína de cápside, en la que lisina (K) está en posición aminoacídica 448; ácido glutámico (E) está en posición aminoacídica 452; y lisina (K) o ácido aspártico (D) está en posición aminoacídica 581. Opcionalmente, la proteína de la cápside tiene una asparragina (N) en el residuo aminoacídico 394 que incluye un sitio de glicosilación.

La invención comprende adicionalmente una composición inmunogénica para inmunización contra una infección viral causada por un calicivirus felino sistémico virulento (VS-FCV), en el que la composición comprende una cantidad inmunológicamente efectiva del VS-FCV seleccionada a partir de FCV-Kaos y de FCV-Ari y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición incluye un coadyuvante. Las cepas VS-FCV pueden

estar muertas, atenuadas, o parcialmente inactivadas.

La presente revelación incluye un procedimiento de inmunizar un gato contra un calicivirus felino sistémico virulento (VS-FCV) que comprende administrar al gato una dosis inmunológicamente efectiva de la composición que comprende una cantidad inmunológicamente efectiva del VS-FCV y un vehículo fisiológicamente aceptable. La vacuna se puede administrar a través de diversas vías, incluyendo pero no limitadas a oronasalmente, subcutáneamente e intramuscularmente.

También está incluida en la presente revelación un procedimiento de detectar un anticuerpo de calicivirus felino sistémico virulento (VS-FCV) en una muestra biológica. El procedimiento incluye poner en contacto la muestra biológica con un antígeno de un VS-FCV y detectar la formación de un complejo inmune. Opcionalmente, el antígeno es un virus completo.

También está incluido en la presente revelación un calicivirus felino sistémico virulento (VS-FCV) aislado que comprende una proteína de cápside, en la que lisina (K) está en la posición aminoacídica 399; treonina (T) está en la posición aminoacídica 430; valina (V) está en la posición aminoacídica 438; lisina (K) está en la posición aminoacídica 448; ácido glutámico (E) está en la posición aminoacídica 452; ácido aspártico (D) está en la posición aminoacídica 581; y en la que el VS-FCV comprende adicionalmente un sitio de glicosilación que incluye una asparragina en posición aminoacídica 394. Ejemplos del VS-FCV incluyen, pero no se limitan a, cepas tales como FCV-Kaos y FCV-Ari.

Breve descripción de las figuras

La presente invención se entenderá mejor cuando se lea en conjunto con las figuras adjuntas que sirven para ilustrar las realizaciones preferidas. Se entiende, sin embargo, que la invención no está limitada a las realizaciones específicas reveladas en las figuras.

La Figura 1 representa un alineamiento óptimo de las proteínas de la cápside m86379 (SEC ID N.º:1); FCV-Ari (SEC ID N.º: 2); FCV-Kaos (SEC ID N.º:); y FCV-Bellingham (SEC ID N.º:4).

Descripción detallada de la invención

Definiciones

Un "calicivirus felino sistémico virulento" (FCV) se refiere a una forma atípica, inusualmente virulenta y altamente contagiosa de calicivirus felino (FCV) que da como resultado un síndrome febril hemorrágico en gatos. Una cepa de VS-FCV de la invención no se puede neutralizar por anticuerpos para cepas de vacuna universales (por ejemplo, FCV-F9), así, el tratamiento de gases con antisuero contra FCV-F9 logra protección insignificante contra infección con VS-FCV. Un VS-FCV de la invención se puede identificar por la incapacidad relativa del antisuero contra FCV-F9 para neutralizar virus en un ensayo *in vitro* estándar como se describe por ejemplo en Pedersen y col. Vet. Microbiol. (2000) 73: 281-300. Un ensayo de anticuerpo neutralizante de virus adecuado para este propósito se describe con detalle más adelante. Brevemente, las valoraciones de neutralización de virus se determinan haciendo reaccionar diluciones seriadas de suero de un gato vacunado con FCV-F9 con una cantidad constante de un FCV a probarse. Se usa efecto citopático (CPE) contra células de riñón felino Crandell (CrFK) para determinar infectividad viral. La última dilución que contenía cualquier CPE detectable se leyó como punto final. Una CPE a una dilución de menos de 1:16 de antisuero anti-FCV-F9 de un aislado capaz de causar enfermedad sistémica mortal, es una indicación de que el FCV es un VS-FCV de la invención.

El término "sustancialmente sin protección" quiere decir que cuando un gato se trata con antisuero contra FCV-F9 o un antisuero similar para FCV-F9, ello no proporciona ninguna inmunidad protectora contra infección con VS-FCV, es decir, el gato presentará uno o más síntomas que definen la infección de VS-FCV o el VS-FCV es capaz de replicar dentro del gato.

El término "posición aminoacídica", cuando se usa en el contexto de sustituciones aminoacídicas que caracterizan aislados de VS-FCV de la invención, se usa para hacer referencia a la posición de un residuo particular en una proteína de cápside cuando se alinea óptimamente con la secuencia de proteínas de la cápside de SEQ ID N.º: 1, que es Número de Acceso de NCBI M86379.1 o GI:323877 (véase también, Carter y col., Arch. Virol., 122(3-4): 223-235 (1992). Un alineamiento ejemplar de secuencias de aminoácidos de cápside se muestra en la Figura 1. Como puede verse ahí, el ácido glutámico (E) se halla en posición 452 de la proteína de la cápside en cada uno de los aislados VS-FCV ejemplificados cuando se alinean óptimamente con SEQ ID N.º: 1. La proteína de la cápside FCV-Kaos (SEC ID N.º: 3), sin embargo, tiene una delección de un residuo de aminoácido en la posición 442. Cuando se alinea óptimamente con SEQ ID N.º: 1, el ácido glutámico (E) hallado en posición 451 en la secuencia de FCV-Kaos corresponde a posición 452 y así se considera que está en la posición 452 para los propósitos de esta invención.

El alineamiento óptimo se determina típicamente por inspección visual tomando en cuenta, por ejemplo, deleciones y adiciones. Una secuencia de proteínas se puede alinear también con SEC ID N.º: 1 usando el algoritmo de BLAST usando parámetros por defecto. El algoritmo de BLAST se describe en Altschul y col., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990). El software para llevar a cabo análisis de BLAST está públicamente disponible por el National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para secuencias de aminoácidos, el programa BLASTP usa por defecto una longitud de palabra (W) de 3, una expectación (E) de 10 y una matriz de puntuación BLOSUM62.

Una "cantidad inmunológicamente efectiva" se refiere a una cantidad de un inmunógeno suficiente para inducir una respuesta inmune humoral o celular detectable en un animal.

Un virus "atenuado" se refiere a un virus que bien es incapaz de colonizar un huésped, bien es incapaz de causar enfermedad en un huésped o bien causa síntomas de enfermedad significativamente reducidos en un huésped. Los virus atenuados carecen típicamente de un componente genético implicado en colonización de huésped o en patogenicidad.

Una "respuesta inmune protectora", como se usa en el presente documento, se refiere a una respuesta inmune celular o humoral que evita o retarda infección o enfermedad causada por un patógeno específico.

Una "muestra biológica" se refiere a cualquier muestra obtenida a partir de un organismo vivo o muerto. Ejemplos de muestras biológicas incluyen fluidos biológicos y especímenes tisulares. Ejemplos de especímenes tisulares incluyen tejido cerebral fetal, médula espinal y placenta. Ejemplos de fluidos biológicos incluyen sangre, suero, plasma, orina, fluido de ascitis, fluido cerebroespinal y fluido fetal.

A) *Calicivirus FCV-Kaos Sistémico Virulento Felino*

La invención actual se refiere a cepas de calicivirus felino sistémico virulento (VS-FCV) novedosas tales como FCV-Kaos que causan un síndrome de fiebre hemorrágica altamente contagioso y mortal. Las cepas de virus que causan brotes de VS-FCV son genéticamente distintas, pero causan enfermedad y resistencia a vacunas similares. La cepa FCV-Kaos novedosa surge por mutación espontánea a partir de poblaciones de gatos de alta densidad y después se dispersa fácilmente a gatos asociados. Además, FCV-Kaos no se neutraliza por anticuerpos para las cepas de vacunas de FCV de rutina (por ejemplo, FCV-F9). Así, los gatos vacunados no están protegidos contra esta cepa mutante. La mortalidad que está asociada con esta nueva cepa es tan alta como el 50% en animales afectados. La fuente de la cepa mutante es a menudo gatitos de refugios que se ven en prácticas privadas. Los virus se dispersan rápidamente por medio de contacto (por ejemplo, gato a gato, persona a gato) para animales de la propiedad de los clientes. Se predice que ese virus se puede extender dentro de la población general de gatos (por ejemplo, 70.000.000 gatos mascotas en los Estados Unidos), probablemente afectando cientos de miles de animales a menos que una vacuna esté disponible para inmunizar a la población de gatos en general. Así, es un objeto de esta invención proporcionar una vacuna que induzca inmunidad más amplia que la disponible hasta la fecha a través de las vacunas de calicivirus actuales para evitar infecciones virales por FCV-Kaos. FCV-Kaos se ha depositado en la American Type Culture Collection con número de acceso PTA- 5798.

Una realización de la invención proporciona una composición inmunogénica para inmunización contra una infección vírica por FCV-Kaos, en la que la composición inmunogénica comprende una cantidad inmunológicamente efectiva del virus y un vehículo fisiológico. Opcionalmente, la composición incluye un coadyuvante. La cepa FCV-Kaos puede estar viva, atenuada, o inactivada.

Los síntomas de la cepa FCV-Kaos incluyen, pero no se limitan a, fiebre alta (es decir, síndrome febril hemorrágico altamente contagioso y mortal); edema facial y de miembros (por ejemplo, hinchazón); ulceración (por ejemplo, formación de costras y pérdida de pelo focal) especialmente en la cara, hocico y pabellones auriculares; ictericia; pancreatitis; disnea; DIC (coagulación intravascular diseminada); muerte en casos graves (la muerte puede ocurrir en algunos gatos con signos precedentes mínimos); hiperbilirrubinemia; hiperglucosemia; CPK incrementada (fosfoquinasa de creatinina); descarga nasal y ocular; ulceración oral; anorexia; y depresión.

En particular, la cepa mutante causa una fiebre similar a la hemorrágica en gatos. Los gatos desarrollan esta fiebre alta, se deprimen, a menudo tienen descarga oral y nasal y comúnmente desarrollan hinchazones en su cara, tronco y extremidades inferiores. Los gatos con signos más leves algunas veces se recuperan en unos pocos días, mientras que los gatos con signos graves a menudo mueren a pesar de tratamiento sintomático exhaustivo. Más específicamente, los gatos los presentan en una manera variable teniendo aproximadamente el 50% edema facial y de zarpas, estando febriles el 90% (con fiebre tan alta como 41,11°C (106°F)); el 50% con signos clásicos de infección del tracto respiratorio superior (URI) tal como descarga nasal y ocular, conjuntivitis y estomatitis vesicular o ulcerativa; el 20% con ictericia; y el 30-40% con hemorragia tal como de nariz y heces. Los hallazgos de la necropsia son también variables, incluyendo consolidación del pulmón y neumonía en el 80% de los gatos; hepatomegalia en el 50% de los gatos; pancreatitis en el 10% de los gatos; y pericarditis en el 10% de los gatos.

El periodo de incubación para esta cepa está en la mayoría de los casos entre 1-5 días. Sin embargo, unos pocos casos parecen haberse desarrollado hasta 12 días después de la última exposición conocida. Gatos de todas las edades, incluyendo gatos vacunados totalmente, están afectados por esta cepa. Un porcentaje significativo de gatos puede continuar propagando virus durante algún tiempo después de la recuperación de signos clínicos, como es el caso con otras cepas de calicivirus felino. Por lo tanto, los gatos pueden ser aún infecciosos para otros tras recuperación temprana.

FCV-Kaos, que es un ejemplo de una cepa de VS-FCV, puede estar presente sistémicamente y puede propagarse en heces y en secreciones nasales, oculares y orales. La transmisión de FCV-Kaos ocurre fácilmente. La dispersión de la enfermedad se facilita por tráfico de clientes y técnicos entre hospitales. El virus se puede dispersar fácilmente por fómites (es decir, cualquier objeto que funcione para transferir infección contaminada por patógenos de una fuente enferma) así como por transmisión directa. Puede llevarse durante al menos varias horas en manos contaminadas, ropa contaminada, instrumentos contaminados, zapatos contaminados y similares. Este virus puede llevarse albergado en ropa contaminada manejando gatos infectados, lo que da como resultado infección de gatos que nunca estuvieron expuestos directamente a un gato enfermo (es decir, transmisión persona-a-gato). La transmisión por gotitas es posible durante una distancia tan larga como 1-2 metros. Aunque, FCV-Kaos se puede transportar a través de sistemas de ventilación en polvo y pelo, la transmisión aerotransportada a lo largo de grandes distancias más grandes que unos pocos pies no está asociada normalmente con esta cepa. El reconocimiento de la naturaleza infecciosa de enfermedad puede retrasarse a menudo debido a que un caso no se ve en el hospital donde la enfermedad se dispersa primero y así tiene lugar dispersión subsiguiente a otros hospitales cuando los propietarios llevan a los gatos infectados en un hospital hasta otro hospital para tratamiento. Así, es importante atención cuidadosa para prevención de transmisión por fómites para prevenir dispersión de FCV-Kaos. VS-FCV puede persistir en el medio ambiente en un estado secado a temperatura ambiente (20°C) durante 28 días. Esto puede jugar un papel en la transmisión aparentemente retardada de la infección.

Cepas de VS-FCV, tales como FCV-Ari y FCV-Kaos, surgen más frecuentemente a partir de ambientes de múltiples gatos tales como refugios y gaterías. Los gatitos paridos por madres persistentemente infectadas pueden propagar VS-FCV virulento mostrando mientras signos clínicos mínimos ellos mismos comparados con gatos adultos. Así, puede haber un papel para los gatitos en propagar VS-FCV. La alta proporción de gatitos, el alto movimiento de la población y la afluencia constante de animales vulnerables comunes a muchos refugios y grupos de rescate incrementan adicionalmente la oportunidad de replicación de virus de alto nivel, cambio de huéspedes, dispersión, replicación y mutación virales. Generalmente, los procedimientos de dispersar la enfermedad tienen implicaciones para procedimientos de control de VS-FCV. En particular, los animales afectados levemente pueden jugar un papel importante en transmisión de enfermedades (*por ejemplo*, un gato aparentemente bien se pone en libertad en el hogar y su miembro de la camada enseguida desarrolla la enfermedad mortal).

Gatos de todas las edades son susceptibles a FCV-Kaos, pero los adultos están en un riesgo significativamente mayor que los gatitos de enfermedad grave y muerte. Éste es a menudo el caso cuando la reacción del sistema inmune está correlacionada con la gravedad de la enfermedad. Los gatos vacunados (*por ejemplo*, FCV-F9) se pueden infectar y sufrir enfermedades graves y muerte a partir de FCV-Kaos, como es comúnmente el caso. Las cepas de VS-FCV son generalmente resistentes a vacunas. Las mutaciones que causan cepas hemorrágicas de FCV pueden unirse a un cambio en la estructura antigénica que confiere resistencia a vacunas. El cultivo viral, la secuenciación de cDNA y la serología de gatos expuestos permiten el reconocimiento de un amplio intervalo de manifestaciones clínicas de enfermedad de VS-FCV, incluyendo infecciones leves y subclínicas. El aislamiento vírico de frotis orofaríngeos por cultivo y PCR prueba ser un procedimiento sensible de diagnosticar enfermedad cuando se obtienen muestras durante la infección aguda o en necropsia. Los cultivos positivos se pueden obtener incluso de gatos asintomáticos poco después de la exposición. Dado que la sensibilidad del aislamiento vírico decrece sustancialmente más tarde en la enfermedad, un frotis negativo único no puede descartar excreción de nivel bajo. La serología es útil para confirmar una historia de exposición y es usualmente sensible y está basada de forma específica en muestras cualesquiera obtenidas durante un brote.

Los aislados de FCV-Kaos están estrechamente relacionados el uno con el otro, pero no están estrechamente relacionados con FCV-Ari, otra cepa de VS-FCV que se ha caracterizado por secuenciación de cDNA según se describe en Pedersen y col. Vet. Microbiol. (2000) 73: 281-300. Esto puede indicar que la mutación que causa la enfermedad de VS-FCV es diferente en cada caso. Debido a que FCV se aísla comúnmente de la cavidad oral de gatos clínicamente saludables y de gatos con URI, el cultivo viral positivo o PCR a partir de un gato con signos de vasculitis no debería considerarse diagnóstico de enfermedad de VS-FCV sin el respaldo de la secuenciación de cDNA que muestra una cepa distinta en más de un gato afectado.

Algunos gatos que sobreviven a infección con FCV-Kaos pueden llegar a ser portadores crónicos, como ocurre comúnmente con otras cepas de FCV. Por ejemplo, los gatos infectados con FCV-Ari se conocen por ser positivos en cultivo hasta 10 semanas después de la infección. Además, la propagación de FCV-Kaos puede persistir al menos 16 semanas en algunos gatos. Así, los portadores crónicos podrían pasar cepas de VS-FCV a otros gatos

mucho después de recuperarse de los signos clínicos. Existe susceptibilidad general a la infección con FCV-Kaos independientemente de la edad, la salud o el estado de vacunación. Aunque una infección altamente virulenta puede exterminar a sus huéspedes más deprisa de lo que la enfermedad puede dispersarse, en el brote documentado en el presente documento (véanse Ejemplos) al menos 32 gatos sobrevivieron y algunos continuaron dispersando el virus de forma indistinguible de FCV-Kaos virulenta. Si el virus retiene la misma virulencia y facilidad de dispersión que se observa temprano en un brote, es probable que brotes adicionales surgieran de su reservorio potencial de gatos infectados. La mutación que conduce a VS-FCV puede revertir durante el tránsito para proporcionar una cepa más o menos virulenta y surgen así cepas divergentes en gatos persistentemente infectados. Así, la infección con FCV-Kaos posee un riesgo significativo para la población gatuna y puede conducir a brotes graves adicionales y a dispersión de la enfermedad.

B) Calicivirus Sistémico Virulento Felino FCV-Ari

La invención actual se refiere también a una cepa de calicivirus sistémico virulento (VS-FCV) novedosa tal como FCV-Ari, un FCV atípico y altamente contagioso. La infección de FCV-Ari en gatos se manifiesta en su forma más grave por una fiebre similar a la hemorrágica que es similar a la observada con infección con FCV-Kaos. El nuevo aislado, FCV-Ari, puede estar parcialmente neutralizado hasta lo desdeñable a valoración baja por antisuero contra la cepa de vacuna universal FCV-F9. Los gatos inmunizados con FCV-F9 y entonces expuestos a prueba poco después a partir de ese momento con FCV-Ari, desarrollan una forma autolimitadora ligeramente más leve de la enfermedad, que indica una protección parcial baja, comparados con FCV-Kaos (*supra*). Sin embargo, los anticuerpos contra la cepa de vacunas universal FCV-F9 no reaccionan de forma cruzada con FCV-Ari y la inmunización con FCV-F9 proporciona sólo una medida pequeña de inmunidad para gatos. Una gran proporción de gatos vacunados previamente (es decir, inmunizados con vacuna FCV-F9 parenteral) mueren pronto después de la exposición a FCV-Ari.

La enfermedad causada por FCV-Ari parece tener como objetivo los vasos sanguíneos, como se evidencia por el edema grave (algunas veces hemorragia) en tejidos subcutáneos y pulmones y por la necrosis local de la piel y de los tejidos adiposos. La pérdida de integridad vascular se refiere a una caída significativa en proteínas séricas, suero icterico (a partir del colapso de los glóbulos rojos extravasados), trombocitopenia variable y coagulopatías. Hay también elevaciones en CPK que indican mionecrosis. Generalmente, las características de esta enfermedad incluyen mortalidad alta, la tendencia a causar enfermedad más grave en animales más viejos, la facilidad de dispersión, la naturaleza aguda, el tropismo hepático y la enfermedad vascular generalizada. Es digno de mención que la infección puede persistir en gatos que están muriendo, es decir, el virus está aún presente en la sangre de un gato en el momento de la muerte. FCV-Ari es una cepa altamente virulenta que es más destructiva para animales más viejos. Empero, los factores de resistencia inherentes pueden jugar también un papel, en que algunos gatos desarrollen enfermedad autolimitada más leve mientras que otros sean devastados por la infección. FCV-Ari, síntomas y enfermedad se describen en detalle en Pedersen y col., Vet. Microbiol. (2000) 73: 281 -300. FCV-Ari se ha depositado en la American Type Culture Collection con el número de acceso PTA-5797.

Una realización de la invención proporciona una composición inmunogénica para inmunización contra una infección vírica por FCV-Kaos, en la que la composición inmunogénica comprende una cantidad inmunológicamente efectiva del virus y un vehículo fisiológico. Opcionalmente, la composición incluye un coadyuvante. La cepa FCV-Ari puede estar viva, atenuada, o inactivada.

Otra realización de la invención proporciona una composición inmunogénica para inmunización contra una infección vírica por VS-FCV, no incluyendo FCV-Ari, en la que la composición inmunogénica comprende una cantidad inmunológicamente efectiva del virus y un vehículo fisiológico. Opcionalmente, la composición incluye un coadyuvante. La cepa FCV-Ari puede estar viva, atenuada, o inactivada.

C) Composiciones Inmunogénicas

Un aspecto de la invención proporciona un procedimiento de inmunizar un gato contra cepas de VS-FCV tales como FCV-Kaos, FCV-Ari, o FCV-Bellingham que comprende administrar al gato una dosis efectiva de una composición inmunogénica de la invención. En una realización preferida de la invención, el virus FCV-Kaos atenuado o muerto está combinado o mezclado con diversas soluciones y otros compuestos como se conocen en la técnica. En aún otra realización preferida de la invención, el virus FCV-Bellingham atenuado o muerto está combinado o mezclado con diversas soluciones y otros compuestos como se conocen en la técnica. Las composiciones inmunogénicas se pueden preparar como inyectables, como soluciones o emulsiones líquidas. Las cepas virales de la invención pueden mezclarse con excipientes farmacéuticamente aceptables. Los excipientes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol y combinaciones de los mismos. La vacuna puede contener adicionalmente sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes tamponadores de pH, o coadyuvantes para potenciar la efectividad de las vacunas.

Las composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden comprender el virus completo y/o las líneas celulares infectadas viralmente. El virus puede estar total o parcialmente inactivado y puede utilizarse como un inmunógeno en la composición. Se puede lograr inactivación parcial por paso a elevadas temperaturas o por contacto con mutágenos, tales como luz ultravioleta, metanosulfonato de etilo y similares. La inactivación completa

5 puede lograrse por contacto con otros agentes, incluyendo formalina, paraformaldehído, fenol, alfa-lactopropionato, luz ultravioleta, calor, psoralenos, complejos de platino, ozono y otros agentes viricidas.

Además del virus completo, las proteínas virales o los péptidos se pueden usar en la preparación de vacunas de subunidades preparadas por técnicas conocidas. Aquellos expertos reconocerán fácilmente que sólo es necesario exponer a un mamífero a epitopos apropiados con el fin de facilitar inmunoprotección efectiva. Los epitopos son

10 típicamente segmentos de la proteína completa. Así, es posible preparar composiciones inmunogénicas de la invención que comprendan proteínas o polipéptidos aislados como inmunógenos en lugar de virus completos atenuados o muertos. Alguien experto reconocerá que tales inmunógenos se pueden preparar usando técnicas recombinantes. Es también rutinario alterar una estructura primaria de proteína natural para crear derivados que abarquen epitopos que son idénticos a o sustancialmente los mismos que (inmunológicamente equivalentes) los

15 epitopos que se dan en la naturaleza. Tales derivados pueden incluir fragmentos peptídicos, sustituciones de aminoácidos, deleciones de aminoácidos y adiciones de aminoácidos dentro de la secuencia de aminoácidos naturales para la proteína objetivo seleccionada. Por ejemplo, se conoce en la técnica de proteínas que ciertos residuos de aminoácidos se pueden sustituir con aminoácidos de tamaño y polaridad similares sin un efecto indebido sobre la actividad biológica de la proteína.

Los polipéptidos que presentan regiones antigénicas capaces de facilitar respuestas inmunes protectoras se seleccionan e incorporan en un vehículo apropiado. Alternativamente, una parte inmunogénica de una proteína viral o de proteínas virales se puede incorporar dentro de una proteína mayor por expresión de proteínas condensadas. La preparación de vacunas de subunidades para otros virus se conoce bien y se describe en diversas referencias, incluyendo Lerner y col. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 3403 y Bhatanagar y col. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 4400. Véanse también, Patentes de los Estados Unidos N.ºs 4,565,697 (donde una proteína viral derivada de forma natural se incorpora en una composición de vacuna); 4,528,217 y 4,575,495 (donde los péptidos sintéticos que forman una parte de una proteína viral se incorporan en una composición de vacuna). Otros procedimientos para formar vacunas que emplean solo una parte de las proteínas virales se describen en las Patentes de los Estados Unidos N.ºs 4,552,757; 4,552,758; y 4,593,002.

20 25

Las vacunas preparadas como se describe anteriormente se pueden administrar de cualquier manera convencional, incluyendo oronasalmente, subcutáneamente, intraperitonealmente o intramuscularmente, salvo porque la administración oronasal no se empleará usualmente con una vacuna de virus parcialmente inactivados. Los coadyuvantes encontrarán también uso con inyección subcutánea e intramuscular de vacunas completamente inactivadas para potenciar la respuesta inmune. La preparación de composiciones vacunales de virus que emplea

30 35 opcionalmente coadyuvantes se describe en numerosas referencias estándar, tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 16ª ed., 1982.

La forma de dosificación y el contenido en inmunógeno de las composiciones de la invención variarán dependiendo de la naturaleza del inmunógeno (es decir, virus completo, célula infectada, o subunidad) y de la vía de administración. Usualmente, una dosis individual tendrá un volumen total que incluye vehículo, coadyuvante y

40 45 cualesquiera otros componentes, en el intervalo desde aproximadamente 0,1 ml hasta aproximadamente 5 ml, siendo más usualmente desde aproximadamente 0,5 ml, siendo más usualmente desde aproximadamente 0,5 ml hasta aproximadamente 3 ml. La cantidad de virus completo inactivado o atenuado en cada dosis estará usualmente en el intervalo de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5 mg, siendo usualmente de aproximadamente 0,2 mg a 2 mg. (Para líneas celulares viralmente inactivadas, cada dosis puede contener típicamente desde aproximadamente 10^6 hasta 10^8 células, usualmente aproximadamente 5 veces 10^6 células a 5 veces 10^7 células).

El número y ritmo de las inoculaciones será suficiente para facilitar la respuesta inmunoprotectora deseada frente a prueba subsiguiente con VS-FCV (por ejemplo, FCV-Kaos, FCV-Ari, FCV-Bellingham). Usualmente, habrá al menos dos inoculaciones espaciadas separadas al menos una semana, siendo más usualmente de dos a 10 inoculaciones espaciadas a lo largo de un periodo de dos a treinta semanas. A menudo, se puede administrar una inoculación final

50 a algún intervalo más largo tras una serie inicial de administraciones. La selección de patrones de administración óptimos para una formación de vacuna particular se conoce bien por el experto en la técnica.

Las composiciones de la invención se pueden formular para administración oronasal. Las formulaciones adecuadas para la administración nasal, en las que el vehículo es un sólido, incluyen un polvo basto que tiene un tamaño de partícula, por ejemplo, en el intervalo desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 500 micrómetros que se administra en la forma en la que se inhala el rape, es decir por inhalación rápida por las vías nasales a partir de un contenedor del polvo sujeto próximo a la nariz. Las formulaciones adecuadas en las que el vehículo es un líquido para administración como, por ejemplo, pulverizador nasal, gotas nasales, o por administración de aerosol por

55

nebulizador, incluyen soluciones aceitosas del ingrediente activo. Se conocen en la técnica diversas formas de tal administración. La formulación farmacéutica para administración nasal se puede preparar en forma de soluciones en solución salina, empleando alcohol bencílico u otros conservantes adecuados, promotores de absorción para potenciar biodisponibilidad, fluorocarbonos, y/o otros agentes solubilizadores o dispersantes conocidos en la técnica.

5 La dosificación unitaria para administración nasal puede ser desde 1 hasta 3000 mg, por ejemplo, 10 a 1000 mg, o 1 a 10 mg de ingrediente activo por forma de dosificación unitaria.

Las vacunas de la invención pueden combinarse con otras vacunas para la misma u otras enfermedades para producir vacunas multivalentes. Una cantidad farmacéuticamente efectiva del inmunógeno se puede emplear con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como una proteína o diluyente útil para la vacunación de mamíferos, particularmente gatos. Se pueden preparar otras vacunas de acuerdo con procedimientos bien conocidos para aquellos expertos en la técnica.

10

Ejemplos de otras vacunas, incluyendo otras vacunas de gatos, que se pueden combinar con FCV 20 Kaos o FCV-Ari atenuados o muertos incluyen, pero no se limitan a, antígenos de virus de panleucopenia, antígenos de herpesvirus felino I, antígenos de virus de leucemia y antígenos de rabia.

15 D) Ensayos para Detectar VS-FCV

Las cepas de virus VS-FCV de la presente invención (*por ejemplo*, FCV-Kaos, FCV-Ari, FCV-Bellingham) y los anticuerpos que se unen a ellas específicamente se pueden detectar y/o cuantificar usando cualquiera de un número de ensayos de unión inmunológicos bien conocidos. Para una revisión de los inmunoensayos generales, véanse también *Methods in Cell Biology: Antibodies in Cell Biology*, volumen 37 (Asai, ed. 1993); *Basic and Clinical Immunology* (Stites & Terr, eds., 7ª ed. 1991). Los ensayos de unión inmunológica (o inmunoensayos) usan típicamente un anticuerpo que se une específicamente a una proteína o a un antígeno de elección. El anticuerpo puede producirse por cualquiera de un número de medios bien conocidos para aquellos expertos en la técnica y como se describe anteriormente. Alternativamente, una proteína o antígeno de elección se puede usar para unir anticuerpos en el suero de un animal infectado. La proteína o el antígeno se puede producir por cualquiera de un número de medios bien conocidos por aquellos expertos en la técnica y como se describe anteriormente.

20

25

Los inmunoensayos usan también a menudo un agente marcador para unirse específicamente y marcar al complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. El agente marcador puede ser por sí mismo uno de los restos que comprenden el complejo antígeno/anticuerpo.

Así, el agente marcado puede ser un antígeno marcado o un anticuerpo marcado. Alternativamente, el agente marcador puede ser un tercer resto, un anticuerpo secundario tal, que se une específicamente al complejo anticuerpo/antígeno (un anticuerpo secundario es típicamente específico para anticuerpos de las especies de las que se deriva el primer anticuerpo). Otras proteínas capaces de unir específicamente regiones constantes de inmunoglobulinas, tales como proteína A o proteína G pueden usarse también como el agente marcador. Estas proteínas presentan una reactividad no inmunogénica fuerte con regiones constantes de inmunoglobulinas a partir de una diversidad de especies (véase, por ejemplo, Kronval y col., *J. Immunol.* 111: 1401-1406 (1973); Akerstrom y col., *J. Immunol.* 135: 2589-2542 (1985)). El agente marcador puede modificarse con un resto detectable, tal como biotina, al que se puede unir específicamente otra molécula, tal como estreptavidina. La estreptavidina puede unirse a una marca o grupo detectable como se discute más adelante. Una diversidad de procedimientos detectables se conoce bien por aquellos expertos en la técnica.

30

35

La marca o grupo detectable en particular usado en el ensayo no es un aspecto crítico de la invención, siempre que ello no interfiera significativamente con la unión específica del anticuerpo usado en el ensayo. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Se han desarrollado bien tales marcas detectables en el campo de los inmunoensayos y, en general, la mayoría de cualesquiera marcas útiles en tales procedimientos pueden aplicarse a la presente invención. Así, una marca es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inorgánicos, eléctricos, ópticos o químicos. Las marcas útiles en la presente invención incluyen perlas magnéticas (por ejemplo, DYNABEADSTM), tinciones fluorescentes (por ejemplo, isocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcas (por ejemplo, ³H, ¹²⁵I, ³⁵S, ¹⁴C, o ³²P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras usadas comúnmente en un ELISA) y las etiquetas colorimétricas tales como oro coloidal o vidrio coloreado o perlas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

40

45

50

Se conocen bien medios de detectar marcas por aquellos expertos en la técnica. Así, por ejemplo, donde la marca es una marca radioactiva, los medios para detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en autorradiografía. Donde la marca es una marca fluorescente, ella puede detectarse excitando el fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, por medio de película fotográfica, por medio del uso de detectores electrónicos tales

55

5 como dispositivos acoplados a carga (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De forma similar, las marcas enzimáticas se pueden detectar proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Finalmente, las marcas colorimétricas simples se pueden detectar simplemente observando el color asociado con la marca. Así, en diversos ensayos de tira reactiva, el oro conjugado a menudo aparece rosa, mientras que diversas perlas conjugadas aparecen del color de la perla.

10 Se conocen bien un número de formatos de ensayo. Los ensayos pueden ser ensayos competitivos o no competitivos. Los ensayos típicos se llevaran a cabo en el formato de ELISA. El análisis de bandas de Western (inmunotransferencia) se puede usar para detectar y cuantificar la presencia de los antígenos virales en una muestra. Otros formatos de ensayo incluyen inmunoensayos de liposomas (LIA), que usan liposomas diseñados para unirse a moléculas específicas (*por ejemplo*, anticuerpos) y liberar reactivos o marcadores encapsulados. Los productos químicos liberados se detectaron después de acuerdo con técnicas estándar (véase, Monroe y col., Amer. Clin. Prod. Rev. 5: 34-41 (1986)).

15 Alguien de habilidad en la técnica apreciará que a menudo es deseable minimizar unión no específica en inmunoensayos. En particular, donde el ensayo implica un antígeno o anticuerpo inmovilizado en un sustrato sólido es deseable minimizar la cantidad de unión no específica al sustrato. Los medios de reducir tal unión no específica al sustrato se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. Típicamente, esta técnica implica revestir el sustrato con una composición proteínica. En particular, las composiciones de proteínas tales como seroalbúmina bovina (BSA), leche en polvo no grasa y gelatina se usan ampliamente con leche en polvo siendo la más preferida.

20 Los ensayos basados en ácidos nucleicos se pueden usar también para detectar la presencia de DNA y de RNA de VS-FCV-Kaos en una muestra. Tales análisis incluyen numerosas técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica, tales como análisis de Southern, análisis de northern, inmunotransferencia, protección de RNAsas, análisis de S1, técnicas de amplificación tales como PCR y LCR, e hibridación *in situ*. En hibridación *in situ*, por ejemplo, el ácido nucleico objetivo se libera de sus entornos celulares de tal forma que está disponible para hibridación en la célula preservando mientras la morfología celular para interpretación y análisis subsiguiente.

25 E) Ejemplos

Se pretende que los ejemplos específicos siguientes ilustren la invención y no deben interpretarse como que limitan el alcance de las reivindicaciones.

Ejemplo 1: Recogida de Datos

30 Un brote de FCV-Kaos ocurrió entre gatos en tres prácticas veterinarias en el área de Los Angeles, CA durante junio y julio de 2002. Se observó un síndrome similar a la fiebre hemorrágica, con gatos afectados mostrando signos de vasculitis, edema facial y de miembros e implicación de órganos múltiple además de los signos más comúnmente observados de infección respiratoria caliciviral. Se documentaron un total de 54 casos. La mortalidad general fue del 40% y la mortalidad en gatos adultos (> 6 meses) fue del 59%. Los gatos adultos sufrieron enfermedad grave o muerte con más probabilidad que los gatitos (proporción de probabilidades 9,56, IC = 2,82 – 32,39, $p < 0,001$). La proporción de ataques fue del 94%. El 21% de los casos fueron leves o subclínicos. Muchos gatos afectados se habían vacunado contra el calicivirus felino, sin embargo, los anticuerpos para la cepa de la vacuna FCV-F9 no neutralizaron FCV- Kaos. De hecho, al menos veintiséis (el 48%) de los gatos afectados tenían una historia de vacunación contra virus del herpes felino, calicivirus y virus de la panleucopenia. La dispersión de FCV-Kaos tuvo lugar dentro de los hospitales y los hogares y entre los hospitales y los hogares por medio de fómites y del movimiento de los gatos infectados. Los Ejemplos 1-8 (véase más adelante) proporcionan una descripción detallada de brote de FCV-Kaos, síntomas de FCV-Kaos, enfermedad por FCV-Kaos, patología por FCV-Kaos y análisis de FCV-Kaos. El Ejemplo 9 (véase más adelante) describe el brote más temprano de una cepa similarmente virulenta y altamente contagiosa, FCV-Ari.

45 La información sobre casos de FCV-Kaos se recogió por encuestadores que intervinieron en persona y por teléfono, y por examen de registros médicos. Se vieron afectadas tres prácticas veterinarias y un grupo de rescate por la cepa de FCV-Kaos.

50 Cada práctica afectada se inspeccionó y todos los registros disponibles de casos sospechosos se revisaron. La información se recogió en todos los gatos hospitalizados como pacientes durante el brote, tanto si ellos mostraban signos de infección como si no lo hacían. Se proporcionó un sumario escrito de todos los gatitos presentes en la red de hogares de adopción del grupo de rescate en el momento del brote por el personal del grupo de rescate.

Se proporcionó un sumario escrito de todos los gatitos presentes en el hogar de adopción del grupo de rescate en el momento del brote por el personal del grupo de rescate.

Ejemplo 2: Definición de los Casos

Los casos de FCV-Kaos se clasificaron como confirmados, sospechosos o posibles.

Un caso "confirmado" se definió como cualquiera de los siguientes:

(a) Un gato del que se aisló y se secuenció genéticamente FCV-Kaos.

- 5 (b) Un gato expuesto a un caso confirmado por secuenciación genética que presentó bien muerte repentina o bien edema en la cara o las patas no explicado por otras causas, y con uno o más signos adicionales de infección caliciviral (*por ejemplo*, fiebre, úlceras orales, descarga ocular o nasal, cojera).

Un caso "sospechoso" se definió como cualquiera de los siguientes:

- 10 5 (a) Un gato expuesto a un caso confirmado, en el que se comunicó muerte súbita o edema o llagas/alopecia/ulceración de la cara o de las patas con otros signos de infección caliciviral pero no se confirmó por un veterinario o para lo cual no se descartaron otras causas .

(b) Un gato expuesto a un caso confirmado y seropositivo para FCV-Kaos pero sin ningún signo clínico anormal comunicado.

Un caso "posible" se definió como sigue:

- 15 Un gato expuesto a un caso confirmado y supuestamente febril, con otros signos de infección respiratoria superior (por ejemplo, úlceras orales, descarga nasal u ocular, anorexia) pero sin edema o muerte y para el que no está disponible cultivo vírico o serología.

Ejemplo 3: Signos Clínicos y Patología

- 20 La fiebre fue el síntoma clínico más comúnmente comunicado en gatos, afectando 44/54 animales (el 81%). La temperatura mediana fue 40,6°C (105,1°F) con un intervalo de 39,4°C a 42,4°C (103,0°F a 106,5°F). Cada edema de miembro y/o cada edema facial se comunicó en 28/54 (el 52%) de los casos (se comunicó edema de miembro en 25 casos; y edema facial en 14 casos). En orden de frecuencia decreciente, otras anomalías comunicadas fueron: úlceras orales (25/54, el 46%); descarga nasal (16/54, el 30%); disnea (9/54, el 17%); llagas, costras o alopecia en la cara, pabellones auriculares, o patas (9/54, el 17%); descarga ocular/conjuntivitis (6/54, el 11%); ictericia patente clínica (6/54, al 11%); efusión pleural (5/54, al 9%); diarrea (4/54, al 7%); vómitos (4/54, al 7%); y cojera (3/54, al 6%). La fiebre hemorrágica incluyó signos que eran característicos de vasculitis y de hemorragia manifiesta. Se observó hemorragia manifiesta en dos casos (de la nariz en un caso y de la nariz y el recto en otro caso).

- 30 La gravedad de la enfermedad variará desde ningún signo en absoluto hasta enfermedad mortal. No se observaron anomalías en 3/54 casos (el 6%) que se consideró que estaban infectados (en base a cultivo viral positivo y secuenciación). En 8/54 casos (el 15%), sólo se observaron signos leves, limitados a úlceras orales, descarga nasal/ocular y fiebre < 40°C (104°F). Se comunicaron signos moderados en 8/54 casos (el 11%), incluyendo fiebre > 40°C (104°F), letargo/inapetencia durante > 1 día, llagas/formación de costras/pústulas de piel, con descarga ocular/nasal y/o úlceras orales. Se comunicaron signos graves que incluyen edema, aflicción respiratoria y/o muerte en 35/54 casos (el 65%); 13 de los 35 gatos con signos graves sobrevivieron.

- 40 La fecha de la primera exposición se determinó en 17 casos. Para estos casos, el tiempo de mediana desde la exposición a la primera observación de signos fue 4 días, con un intervalo de 1 a 12 días. Los tiempos de incubación aparentes más largos tuvieron lugar en gatos expuestos de forma secundaria por otro gato enfermo en el hogar. En gatos expuestos como pacientes, el tiempo más largo observado entre exposición y observación de signos fue de 5 días. Un gato desarrolló signos hasta 34 días después de su primera exposición probable. Puede haber estado expuesto una segunda vez entre 2-15 días antes de la aparición de los síntomas.

- 45 Los paneles de química de la sangre estuvieron disponibles para 10 casos. Los hallazgos anormales en química de la sangre incluyeron hiperbilirrubinemia en 6/10 casos (intervalo 0,6-3,9 mg/dl, intervalo de referencia = 0,1-0,4 mg/dl); hipoalbuminemia en 5/10 casos (intervalo 1,1-2,1 g/dl, intervalo de referencia 2,5-3,9 g/dl); aspartato aminotransferasa (AST) elevada en 3/10 casos (intervalo 103-223 UI/l, intervalo de referencia 10-100 UI/l); alanina aminotransferasa (ALT) levemente elevada en 2/10 casos (intervalo 102-116 UI/l, intervalo de referencia 10-100 UI/l); y fosfoquinasa de cretina elevada (CPK) en 5/10 casos (intervalo 639 - 10930 UI/l, intervalo de referencia 56-529 UI/l).

Estuvieron disponibles cuentas de sangre completas para 8 casos. 3/8 casos tuvieron una neutrofilia suave (intervalo

8549-11616 células/μl, intervalo de referencia 2500-8500 células/μl), y 5/8 tuvieron una linfopenia leve a moderada (intervalo 180-1188 células/μl, intervalo de referencia 1200-8000 células/μl). El hematocrito estaba ligeramente disminuido en 2/8 casos (el 25%, intervalo de referencia 29-48%).

5 Estuvieron disponibles resultados de necropsia burdos para cinco gatos. En todos los gatos hubo abundante edema subcutáneo amarillo brillante afectando de la forma más marcada la cara y los miembros. En dos gatos el edema dependiente se extendió a lo largo de la pared torácica y afectó las regiones inguinales y axiales. La conjuntiva estaba roja e inflamada con material costroso adherido a los cantos mediales. Las úlceras estaban presentes en todos los gatos aunque los sitios y la extensión fueron variables. Tres gatos tuvieron ulceración circunferencial en la articulación entre las almohadillas de las patas y la piel vellosa. En dos gatos hubo diámetro de 0,4 cm para úlceras coalescentes de las superficies de la lengua dorsal lateral y ventral. En dos casos, aunque la lengua no apareció afectada hubo ulceración del septo de las narinas y de la piel vellosa que recubre la nariz. En todos los gatos hubo hasta 100 ml de fluido rojo pálido, ligeramente opaco dentro de las cavidades abdominal y torácica y en un gato hubo fluido pericárdico extenso de carácter similar. En dos casos, hubo necrosis grasa del epiplón multifocal. El análisis histológico reveló que las ulceraciones en todos los casos correspondieron a regiones vastas microscópicas de necrosis y ulceración epiteliales con inflamación mínima. La dermis superficial que subyace a esta región estaba a menudo desorganizada y expandida por edema y restos celulares. El resto de la dermis estaba mínimamente afectada exceptuando extensión ocasional de la necrosis en el epitelio folicular. En tres gatos estaba presente necrosis hepática masiva o centrilobular, peraguda.

Ejemplo 4: Serología

20 Se recogió suero de 19 gatos que sobrevivieron a la infección con FCV-Kaos, y de 2 gatitos que pudieron estar indirectamente expuestos pero que presumiblemente no estuvieron infectados (en base a ausencia de signos clínicos y de cultivo viral negativo). Se recogieron muestras de suero 1-6 semanas después del tiempo estimado de infección o exposición. Las valoraciones que neutralizan virus se determinaron haciendo reaccionar diluciones en serie de cuatro veces de suero con una cantidad constante de virus. Las diluciones de suero fueron 1:4, 1:16, 1:64, 25 1:256, 1:1024, 1:4096 y 1:16.384. Las células de riñón felino de Crandell (CrFK) se usaron en placas de 96 pocillos para la valoración.

50 μl de suero del paciente se diluyeron en serie cuatro veces (1:4 a 1:16,384, *supra*) con medio de cultivo de tejidos en placas de 96 pocillos. 50 μl de medio de cultivo de tejidos que contenían aproximadamente 1000 DICT₅₀ (1000 dosis infecciosas de cultivo de tejido) de FCV se añadieron después a cada pocillo y se incubaron durante 1-2 horas a 37°C. La mezcla de suero/virus de cada pocillo se transfirió después en los pocillos correspondientes de una placa de cultivo que contenían células CrFK, recientemente concluyentes, de 1-2 días de edad. Cada suero se probó frente a tres aislados de virus: FCV-F9 (cepa de vacuna), FCV-Kaos y FCV-case 53 (un aislado de campo no relacionado del caso 53). Las placas se incubaron durante 24 horas y se observaron en un microscopio invertido para CPE (efecto citopático) de FCV típico. El último pocillo que contenía cualquier CPE detectable se leyó como 35 punto final. Un CPE a una dilución de 1:16 o mayor se consideró un resultado positivo.

Los resultados de serología se muestran en la Tabla 1 más adelante. Todos los gatos bien con infección de FCV-Kaos confirmada o bien albergados en la misma jaula que un gato positivo en FCV-Kaos fueron seropositivos a FCV-Kaos. Todos los gatos albergados en la misma jaula que el caso 53 eran seropositivos a FCV-53, igual que lo eran dos gatos en el grupo 6 sin ninguna historia conocida de exposición al caso 53 o a FCV-Kaos. Estos gatos nunca mostraron signos clínicos de infección, fueron negativos en cultivo para infección de FCV, y fueron seronegativos para ambas cepas víricas. No hubo evidencia de reacción cruzada entre FCV-F9 y bien FCV-Kaos o bien FCV-53 (niveles de anticuerpo neutralizante de virus < 1:4).

Tabla 1

N.º Caso	deGrupo ¹	Estatus vacuna	de Grave- dad	Valoración de Anticuerpo para Cepa de FCV			
				FCV-caso53 ²	Vacuna (FCV- F9)	FCV-Kaos	Aislado de Cepa FCV
53	1	Sí	3	1:16	1:16	1:16	FCV-caja53, FCV-Kaos ³
41	1	no	4	1:256	1:16	1:256	FCV-Kaos
54	1	no	2	1:256	1:16	1:64	FCV-Jengo ⁴
52	1	Sí	3	1:64	1:16	1:16	Ninguno ⁵
51	1	Sí	2	1:256	1:16	1:64	Ninguno
40	1	Descono- cido	3	1:256	1:16	1:16	Ninguno
50	1	Sí	2	1:1024	1:16	1:64	Ninguno
R1 ⁶	2	Sí	0	1:4	1:64	<1:4	Ninguno
R2 ⁶	2	Sí	0	<1:4	1:4	<1:4	Ninguno
32	3	Sí	2	<1:4	1:4	1:256	Ninguno
33	3	Sí	1	1:4	1:4	1:64	FCV - Kaos
31	4	Sí	3	<1:4	1:16	1:64	Ninguno
35	5	Sí	4	<1:4	1:64	1:256	FCV-Kaos
36	5	Sí	4	1:4	1:16	1:1024	FCV-PM
34	5	Sí	4	<1:4	1:16	1:256	Ninguno
12	6	Sí	4	1:4	1:16	1:64	Ninguno
18	6	Sí	4	1:4	1:4	1:64	FCV-Kaos
(CONT)							
9	6	Sí	4	1:4	1:64	1:256	Ninguno
10	6	Descono- cido	4	1:4	1:4	1:256	FCV-Kaos
11	6	Sí	4	1:16	1:64	1:256	Ninguno
21	6	Descono- cido	4	1:64	1:16	1:256	FCV-Kaos

¹ Los grupos 1-5 fueron gatitos del grupo de rescate. Cada grupo se albergó en una jaula separada, pero todos estaban en la misma área general y cuidados por los mismos cuidadores. Los gatos del grupo 6 fueron de una práctica; los gatos se albergaron en aislamiento en jaulas separadas.

² La cepa de campo de calicivirus se aisló de un gatito rescatado durante brote y asociado con signos de URI leves.

³ FCV-case53 se aisló antes de exposición al caso 41; FCV-Kaos se aisló después de exposición al caso 41.

5 ⁴ La cepa de campo de calicivirus se aisló a partir de 2 gatitos rescatados durante el brote, en la que ambos gatitos tuvieron signos de enfermedad del hígado grave.

⁵ No se aisló FCV en 2-5 intentos durante las 10 semanas de periodo de seguimiento.

⁶ R1 y R2 no fueron nunca sintomáticos o positivos en cultivo para infección de calicivirus y por lo tanto no se consideraron casos.

10

Ejemplo 5: Histología

Todas las muestras de tejido se fijaron en formol-solución salina tamponada neutra al 10%. Los tejidos seleccionados se embebieron en parafina, se seccionaron a 4 µm y se montaron en portaobjetos cargados positivamente (Superfrost/plus, Fischer Scientific, Pittsburgh, PA). Las secciones de tejidos se tiñeron con hematoxilina y eosina (HE) para examen de microscopía óptica de rutina.

15

Ejemplo 6: Aislamiento, Cultivo y Secuenciación Viral

Se proporcionaron 77 cultivos. 19/77 cultivos fueron de gatos de los que se tomaron muestras una vez y 18/77 fueron de gatos de los que se tomaron muestras 2-5 veces a intervalos de 1-3 semanas. El aislamiento viral llevado a cabo en el pico de signos clínicos fue positivo en el 88% (15/17) de los casos. En algunos de los gatos de los que se tomaron muestras repetidamente, se observó propagación intermitente y persistente.

20

Se aislaron calicivirus a partir de suero de gato y se cultivaron en una monocapa confluyente de células de riñón felino de Crandell (CrFK) a partir de bazo o pulmón recién recogidos, sangre completa anticoagulada por EDTA, descarga nasal, o secreciones orofaríngeas recogidas en torundas de algodón estériles y transportadas en solución salina estéril o en solución salina estéril con la adición de 0,02 mg/ml de penicilina y amikacina. Las células se mantuvieron a 37°C en el aire con CO₂ al 5% y con los medios de crecimiento que contenían una mitad de medios Liebovitz L-15 y una mitad de MEM (medios esenciales mínimos de Eagle). Los medios contenían FBS al 10% (suero fetal bovino), 100 U penicilina G/ml y 100 µg de estreptomina/ml de medios. Una infección viral se confirmó por la presencia de un efecto citopático característico (CPE) en células de 12-52 horas. Después de inoculación, el fluido de cultivo de tejido se recogió de todas las células infectadas y el RNA total se extrajo usando un kit (Qiagen Tissue Kit, Chatsworth, MA). Se llevó a cabo transcripción inversa/reacción en cadena de la polimerasa jerarquizada como se describe en Pedersen y col., *Vet Microbiol* 73(4): 281-300 (2000). Todos los aislados aparentemente positivos en cultivo fueron PCR-positivos. Los fragmentos se purificaron por Columnas Microcon-50 (Millipore Corp, Bedford, MA) y todos los resultados positivos se confirmaron por secuenciación, es decir, por secuenciación de cDNA usando un servicio de secuenciación (Davis Sequencing, Davis, CA). Así, FCV-Kaos se aisló y se confirmó por secuenciación de cDNA. De hecho, todos los resultados positivos se confirmaron por secuenciación de cDNA.

25

30

35

Ejemplo 7: Caracterización Viral

Los aislados virales a partir de gatos sintomáticos y expuestos se secuenciaron y compararon con varias cepas de campo de FCV, cepa de vacuna (FCV-F9) y FCV-Ari (una cepa VS-FCV aislada en un brote de la zona norte de California de 1998 como se describe en Pedersen y col., *Vet Microbiol* 73: 281-300 (2000) (*supra*). Todos los aislados de FCV-Kaos se agruparon dentro de un único clado, siendo genéticamente distintos de las otras cepas usadas para comparación. Los aislados de FCV-Kaos se caracterizaron por una delección de tres pares de bases no observadas en las otras cepas.

40

Ejemplo 8: Análisis Estadísticos de Gatos Infectados

El sumario de los datos se llevó a cabo en "R" (el Equipo Nuclear de R-Desarrollo) que es un lenguaje y un ambiente para computación estadística y gráficas similar al lenguaje S y al ambiente que se suministró en Bell Laboratories (anteriormente AT&T, ahora Lucent Technologies). R se puede considerar como una implementación diferente de S. Hay algunas diferencias importantes, pero mucho del código escrito para S funciona inalterado en R (Richard A. Becker, John M. Chambers y Allan R. Wilks. *The New S Language*. Chapman & Hall, Londres, 1988). Asociaciones posibles de casos con edad, estado de vacunación y sexo se evaluaron por pruebas de contingencia de chi-cuadrado. La evaluación univariada de factores de riesgo posibles se llevó a cabo calculando proporciones de

45

50

probabilidades e intervalos de confianza (“probabilidades” de función en R). Los valores de $P < 0,05$ se consideraron significativos.

La proporción de ataque para gatos bien hospitalizados concurrentemente con un gato caso durante >12 horas o bien de la misma casa que un gato caso fue del 94% (47/50). La proporción de mortalidad de casos general fue del 41% (22/54). En gatos > 1 año de edad, la proporción de mortalidad de casos fue del 59% (19/32) y en gatitos < 6 meses de edad fue del 14% (3/22). Los gatos adultos (> 1 año de edad) tuvieron probabilidades significativamente más altas que los gatitos (< 6 meses de edad) para enfermedad grave o muerte (proporción de probabilidades 9,56, IC = 2,82, 32,39, $p < 0,001$). El sexo no fue un factor de riesgo significativo para enfermedad grave o muerte. De pocos de los gatos se sabía que no hubiesen sido vacunados; por lo tanto el riesgo asociado con vacunación no pudo valorarse en gatos adultos. De los gatitos cuyo estado de vacunación era conocido, 7 habían recibido una vacuna intranasal viva modificada y 11 habían recibido una vacuna subcutánea viva modificada. No hubo ninguna diferencia significativa en probabilidad o gravedad de enfermedad entre estos dos grupos de gatitos vacunados.

Ejemplo 9: FCV-Ari

En 1998, otro brote de una cepa altamente virulenta, resistente a vacunas de V-S-FCV, FCV-Ari, asociada con una fiebre similar a hemorrágica, se comunicó en la zona norte de California como se describe en Pedersen y col., *Vet Microbiol* 73: 281-300 (2000) (*supra*). La muerte ocurrió en el 33-50% de los gatos infectados por FCV-Ari y esta cepa demostró dispersión altamente contagiosa por medio de fómites contaminados a pesar de las precauciones higiénicas en hospitales veterinarios y en las colonias de investigación. Los signos clínicos distintivos incluyeron edema facial y de miembros en gatos febriles y la muerte súbita en algunos casos con pocos signos precedentes. Dada la comunicación del brote de 1988, se han reconocido al menos cuatro brotes focales de fiebre hemorrágica similar a FCV en Pensilvania, Massachusetts, Tennessee y Nevada.

Ejemplo 10: Patrones Epidemiológicos

Los casos clínicos de infección con VS-FCV fueron incidentes aislados o agrupados en epidemias caracterizadas por aparición y dispersión rápidas, con conclusión enigmática, gradual o brusca. Los casos se clasificaron como confirmados, sospechosos, o posibles. Un *caso confirmado* se definió como un gato con un historial de exposición consistente (es decir, a partir de una práctica afectada o con contacto con un caso confirmado) del que se recuperó una cepa de FCV con secuencias de regiones hipervariables de cápsides idénticas con una cepa de caso conocido en la misma epidemia. Un *caso sospechoso* se definió como un gato que hubo estado expuesto a un caso confirmado y en dos semanas desarrolló signos clínicos de infección por VS-FCV, o un gato que se hubo expuesto a un caso confirmado y que murió repentinamente en dos semanas, o un gato que hubo estado expuesto a un caso confirmado y fue seropositivo por seroconvertido, independientemente de si el gato tuvo o no tuvo anomalías clínicas. Un *caso posible* se definió por exposición a un caso confirmado con desarrollo de fiebre o infección del tracto respiratorio superior (URI) para el que no estuvo disponible cultivo viral ni prueba serológica.

El primer reconocimiento del nuevo síndrome fue durante una epidemia focal grande que implicó seis gatos en la zona norte de California, de la que se recuperó de forma consistente una cepa resistente a vacunas de FCV, designada FCV-Ari. Sólo los gatos expuestos en una clínica estuvieron implicados y la epidemia se detuvo bruscamente. Subsecuentemente, se han reconocido brotes pequeños en Pensilvania, Massachusetts, Tennessee y Nevada. En verano de 2002, tuvo lugar un brote de 54 casos entre tres prácticas veterinarias en el área de Los Angeles. Una investigación de este brote se llevó a cabo prospectivamente y la inclusión de información serológica, molecular, clínica y patológica proporcionó comprensión valiosa dentro de la epidemiología de este patógeno novedoso. VS-FCV se diseminó rápidamente en el brote en Los Angeles e infectó virtualmente a todos los gatos en contacto con gatos caso. Los cuatro primeros casos se hospitalizaron para cuidado de rutina y desarrollaron fiebre e infecciones del tracto respiratorio superior (URI) más edema y formación de costras de los pabellones auriculares. Todos los cuatro gatos se recuperaron y no se sometieron a seguimiento. Una semana más tarde, un gato en un hospital adyacente desarrolló infección de VS-FCV peraguda con fiebre y detención cardiopulmonar mortal. Durante la semana siguiente, la epidemia emergió rápidamente incluyendo 14 gatos en estas dos prácticas y dos gatos en el hogar de un técnico veterinario. En 8 semanas, al menos se hubieron infectado 54 gatos de los que 22 murieron, incluyendo muchos gatos maduros que habían estado previamente completamente saludables. La proporción de ataque para gatos bien hospitalizados concurrentemente con un gato caso durante más de 12 horas o bien de la misma casa que un gato caso fue del 94% (47/50). El tiempo de mediana de exposición a los primeros signos clínicos fue de cuatro días (intervalo 1-12 días). Los tiempos de incubación más largos tuvieron lugar en gatos expuestos de forma secundaria por otro gato enfermo en el hogar. Por ejemplo, un gato llegó a estar enfermo 34 días después de la primera exposición y 2-15 días después de una segunda exposición. En los gatos expuestos como pacientes, el tiempo más largo observado entre exposición y observación de signos fue 5 días. El aislamiento viral llevado a cabo en el pico de los signos clínicos fue positivo en el 88% de los casos. (El cultivo de FCV se llevó a cabo usando sangre anticoagulada por EDTA, secreción orofaríngea, o especímenes de bazo y de pulmón recogidos al tiempo de la necropsia. Los especímenes se cultivaron en una monocapa confluyente de células de riñón felino de

Crandall a 37°C en el aire con CO₂ al 5% en medio Liebovitz L-15 y medio esencial mínimo de Eagle 1:1 con suero bovino fetal al 10%, 100 U de penicilina G/ml y 100 µg de estreptomina/ml. Se confirmó la infección por la presencia de efectos citopáticos característicos en 12 a 52 horas). En algunos de los gatos de los que se tomaron muestras repetidamente, se observó propagación intermitente y persistente. El periodo de incubación en cepas de campo de FCV respiratorio es sólo 1-2 días y la propagación del virus ocurrió de dos días a meses después de la infección a partir de descarga ocular y nasal, saliva y heces de gatos con o sin signos clínicos de infección. Las vías de dispersión del virus en la epidemia de VS-FCV incluyeron transmisión directa gato-a-gato, transmisión de fómites entre clínicas y a hogares por medio de clínicos y propietarios y la transmisión a pacientes externos por medio de un paciente vehículo asintomático. La transmisión declinó después de que las áreas contaminadas se limpiaron minuciosamente con hipoclorito de sodio. El calicivirus puede persistir en el ambiente en un estado seco a temperatura ambiente durante varias semanas y el calicivirus que causa enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) permaneció infectivo en tela a temperatura ambiente durante 105 días.

Aunque la mortalidad general en la epidemia de Los Angeles fue 40, se observó mortalidad significativamente más alta (59%) en gatos de más de 6 meses de edad, con mortalidad de sólo el 14% en gatitos menores de 6 meses de edad (proporción de probabilidades 9,56, IC = 2,82 – 32,39, P < 0,001). El 48% de los gatos afectados habían sido vacunados contra el herpesvirus felino, FCV, y el virus de la panleucopenia (siete gatos con vacuna masiva de antígeno elevado intranasal y once gatos con vacuna subcutánea viva modificada). Incrementarse o no la vacunación el riesgo de enfermedad, no es protectora. El género no fue un factor de riesgo significativo para enfermedad grave o muerte. La duración total de la epidemia fue de seis semanas.

20 **Ejemplo 11: Patogénesis**

La infección con VS-FCV fue distintiva en su gravedad clínica, en su tropismo para células epiteliales, en su ataque multisistémico, en su inducción de compromiso vascular sistémico y en su velocidad de implicación de órganos viscerales incluyendo pulmones, páncreas e hígado. Se evaluaron siete gatos a partir de dos brotes de VS-FCV patológicamente en detalle exhaustivo. Todos los siete gatos tuvieron edema subcutáneo y ulceración de la cavidad oral, con ulceración variable de los pabellones auriculares, almohadillas de las zarpas, narinas y piel. Otras lesiones que estuvieron presentes en algunos gatos afectados incluyeron neumonía broncointersticial y necrosis pancreática, hepática y esplénica. La extensión y el sitio de úlceras variaron marcadamente, afectando más frecuentemente y más gravemente el dorso de la lengua, con numerosas úlceras menores en el paladar óseo y la encía. Las lesiones en las patas variaron de hiperhemia circunferencial a la articulación vellosa/no vellosa para el desprendimiento de las almohadillas de las patas. Las úlceras aparecieron de forma variable en la nariz, en los pabellones auriculares y en la piel vellosa. Todos los gatos tuvieron edema subcutáneo marcado de la cara y los miembros. Histopatológicamente, las lesiones representadas fueron necrosis epitelial y ulceración, con necrosis epitelial segmental del estrato basal, estrato espinoso y de los folículos temprana en piel vellosa, para necrosis epitelial de grosor total con degeneración de hinchazón en capas superficiales y pérdida de margen epitelial-subepitelial distintivo en las lesiones más crónicas. Las lesiones de almohadillas de zarpas fueron más graves en la articulación entre piel vellosa y no vellosa.

Todos los gatos tuvieron edema pulmonar, cuatro gatos con efusión pleural sanguinolenta y otros cuatro con neumonía broncointersticial. Las lesiones pulmonares agudas revelaron leucocitosis circulante, edema alveolar regional y células epiteliales necróticas en espacios alveolares. En lesiones graves, el intersticio alveolar se expandió por hiperplasia de pneumocitos de tipo II, acumulación de leucocitos en capilares alveolares y microtrombos. Los alveolos se cargaron de forma variable con histiocitos espumosos, restos celulares, fibrina y glóbulos rojos. Muchos gatos afectados también tuvieron signos de implicación hepática o pancreática con hiperbilirrubinemia y AST y creatina quinasa elevadas. Hubo múltiples focos pequeños, discretos de necrosis grasa peripancreática y de epiplón en tres gatos. En gatos con implicación hepática hubo individualización difusa de hepatocitos a desbaratamiento extensivo de placas hepatocelulares con células a necrosis centrilobular. La inflamación se limitó a pequeños grupos de neutrófilos intrasinusoidales adyacentes a focos necróticos. Cuatro de los siete gatos tuvieron necrosis pancreática multifocal, peraguda con saponificación de grasa adyacente. Un gato tuvo necrosis esplénica y linfoide masiva.

La tinción inmunohistoquímica con un anticuerpo monoclonal para FCV y la microscopía de transmisión de electrones documentó antígeno viral en células endoteliales y epiteliales en piel afectada, mucosa nasal, lengua, mucosa bucal, pabellón auricular y almohadillas de las patas (toda la formalina fijada, tejidos embebidos en parafina se tiñeron inmunohistoquímicamente usando el anticuerpo monoclonal anti-calicivirus felino CV8-1A (c) proporcionado por Custom Monoclonals Inc., Sacramento, California). La intensidad de tinción fue proporcional a la gravedad de la lesión, del estrato basal y espinoso en lesiones tempranas para todas las capas de epitelio con cronicidad. El virus estuvo presente en células endoteliales en vasos pequeños por toda la submucosa, en células pancreáticas exocrinas asociadas con regiones de necrosis, en los septos alveolares de pulmones y en células de forro de los bronquiolos pequeños en lesiones crónicas de neumonía broncointersticial. Usando microscopía electrónica, se detectó virus en células epiteliales de las almohadillas de las zarpas, con viriones maduros dentro de

núcleos epiteliales.

La enfermedad inducida por VS-FCV puede manifestarse como fiebre, edema, fallo multiorgánico, hemorragia, choque y muerte. El riesgo incrementado de enfermedad grave en gatos más viejos y/o en gatos sometidos a vacunación sugiere un componente mediado por el sistema inmune además de posible daño celular directo inducido por el virus. Las células inflamatorias no se apreciaron en las lesiones agudas independientemente de la gravedad. Las respuestas inmunes adaptativas pudieron haber contribuido a la gravedad de la enfermedad, por ejemplo, por potenciación dependiente de anticuerpo. Aunque la progresión de la enfermedad fue demasiado rápida para implicar una respuesta adaptativa primaria, los gatos vacunados han tenido respuestas inmunes amnésicas, como tendrían muchos de los gatos no vacunados dada la exposición general a cepa FCV de campo. Este factor de riesgo relacionado con la edad para la gravedad de la enfermedad fue similar a aquel en enfermedad hemorrágica de conejo (RHD), donde los conejos jóvenes sufren enfermedades autolimitantes mientras que los conejos más viejos experimentan mortalidad de casi el 100%.

Una evaluación de citocinas (*infra*) en muestras de piel de gatos con infección de VS-FCV se llevó a cabo para entender los roles contributivos de las citocinas e indirectamente de algunos posibles efectores celulares de daño y enfermedad. Hubo un incremento estadísticamente significativo en TNF- α en tejidos afectados comparados con controles ($P = 0,05$). Los tejidos afectados tuvieron, en promedio, 3,8 citoquinas elevadas mientras que los controles tuvieron sólo 1,4 ($P = 0,041$), con regulación al alza prominente particularmente en IL-10, TNF- α y MIP-1 α .

MIP-1 α es una quimioquina en la familia C-C conservada, segregada por numerosos tipos celulares. Es quimioatrayente principalmente para macrófagos y monocitos, pirógena y un potenciador de producción de IFN- γ . IL-10 se segrega por linfocitos T_H2 CD4⁺, linfocitos CD8⁺ y macrófagos, aunque ello retroalmente e inhiba liberación de citoquinas de macrófagos adicional. En la piel, IL-10 estimula las células cebadas y los linfocitos B que producen IgA y regula al alza la expresión de MHC-II. TNF- α es una citocina de T_H1 de macrófagos, linfocitos y otros y ha sido muy importante en la patogénesis de VS-FCV en virtud de su capacidad para incrementar la permeabilidad vascular, estimular las respuestas de fase aguda de hígado e inducir la activación del complemento, la fiebre y el choque. Estos cambios con microtrombos, coagulación intravascular diseminada y finalmente muerte se iniciaron por invasión viral de endotelio y epitelio, en contraste con algunos agentes de compromiso vascular sistémico que están asociados con vasculitis inflamatoria, endotoxina bacteriana y activación del sistema de kalikreína-quinina como en RMSF, vasculitis debida a deposición de complejo inmune como en peritonitis infecciosa felina, o citotoxicidad tisular viral directa e invasión de monocitos como en enfermedad hemorrágica del conejo (RHD).

Las citocinas que incluyen IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p40, IL-18, IFN- γ , IFN- α , TNF- α , MIP-1 α y RANTES se evaluaron por PCR de TaqMan de cDNA según se describe en Foley y col. (Foley, J., C. Rand y C. Leutenegger; en proceso de publicación; *Inflammation and changes in cytokine levels in neurological feline infectious peritonitis; Journal of Feline Medicine and Surgery*) con modificaciones. El tejido de la piel fijo en formalina que corresponde a áreas con lesiones de VS-FCV visibles al microscopio electrónico o a controles no afectados se escindió de forma estéril de bloques de parafina, se desparafinó con xileno, se extrajo el RNA usando un kit (Qiagen Tissue Kit, Valencia, CA) y se transcribió con cebadores de hexadesoxirribonucleótidos aleatorios (pd(N)₆) (hexámero aleatorio; Promega, Madison, WI) y con transcriptasa reversa superscript II (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island, NY). La PCR se llevó a cabo en un termociclador/fluorómetro (ABI Prism 7700 Sequence Detection System, Applied Biosystems) y se hizo una cuantificación final usando el procedimiento C_T comparativo (Leutenegger y col. (1999) *Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA; Veterinary Immunology and Immunopathology* 71: 291-305) comunicada como transcripción relativa a un calibrador interno (GAPDH). Los niveles de citocinas entre muestras afectadas y controles no afectados se compararon con prueba t duplicada, con $P <$ como un límite para establecer significancia estadística.

Ejemplo 12: Estudios Genéticos y Virología Molecular

La aparición rápida de un síndrome clínico asociado a FCV novedoso sugirió que las variantes de FCV genéticas nuevas pueden ser responsables. Los calicivirus son virus RNA de cadena simple de sentido positivo sin cubierta e incluyen FCV, virus de la enfermedad hemorrágica del conejo (RHDV) y virus porcino de exantema vesicular. Las partículas de VS-FCV son de 32-35 nm con bordes festoneados e indentaciones de superficie que son típicas de Caliciviridae con un núcleo central, electrodenso de 20 nm de diámetro central y marco menos electrodenso, con simetría icosaédrica T=3. Como otros miembros de la familia Caliciviridae, FCV es propenso a altas tasas de mutación y a reparación mínima.

Con el fin de determinar si hay una mutación única que tuvo lugar en cepas de VS-FCV y que las discriminó de otras "cepas de campo", se han llevado a cabo estudios genéticos en la región hipervariable de la cápside y a nivel del genoma completo. Se llevó a cabo PCR como se describe previamente (Pedersen y col. (2000) *An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus; Veterinary Microbiology* 73: 281-300) obteniéndose un amplicón de 235 nucleótidos en la región hipervariable de cápside viral

- para secuenciación de gatos afectados y no afectados. Cuando los aislados de los brotes de la zona norte de California y la zona sur de California se compararon con los VS-FCV de Carolina del Norte y Florida, F9 (la cepa de vacuna) y las cepas de campo misceláneas, todos los aislados del brote de Los Angeles se agruparon en un clado individual, genéticamente distinto de las cepas usadas para comparación. Las cepas de VS-FCV de regiones diferentes no se agruparon todas juntas. Los aislados de FCV-Kaos (de Los Angeles) se caracterizaron por una delección de tres pares de bases, pero esta delección se perdió en los VS-FCV de otros brotes. La homología entre secuencias de FCV-Kaos y FCV-F9 fue del 73,4% y la homología entre secuencias de FCV-Kaos y FCV-Ari (de Carolina del Norte) fue del 76,5%. FCV-Ari está muy cercanamente relacionada con la cepa de vacuna.
- 5
- El genoma completo de FCV-Ari y FCV-Kaos se secuenció y se comparó con otros genomas comunicados previamente, incluyendo el genoma de cepas de la vacuna. A este nivel, FCV-Ari continuó agrupándose con la vacuna y fue bastante distinto de FCV-Kaos, con sólo el 80,3% de homología entre los dos. Se compararon las traducciones de aminoácidos predichas para los tres fases de lectura de FCV. En la fase de lectura abierta 1 (ORF 1), hubo solo tres cambios específicos (es decir, consistentes entre las cepas de VS-FCV y distintos de todo el campo comunicado de cepas de vacunas), tales como: E → D en la posición 294, N → S en la 1055 y T en la 1314 (diversos aminoácidos en las cepas de campo). Hubo siete residuos de aminoácidos específicos de VS-FCV en el gen de la cápside, incluyendo E → K a 399, V → T a 430, T → V a 438, A → K a 448, D → E a 452, R → K o D a 581 y S → D a 592 y cambios no consistentes en ORF-3. Todos los siete cambios en la cápside ocurrieron generalmente en la misma región de 398-592. De forma interesante, se predijo que la estructura proteica diferiría en la cápside con un sitio de glicosilación extra en los VS-FCV comparados con las cepas de campo.
- 10
- 15
- 20 Los calicivirus tienen una proteína de cápside estructural individual única con funciones en RNA y en unión a células huésped.
- Los virus tienen numerosos capsómeros similares a arco, cada uno de los cuales es un dímero de proteína de cápside. Las interacciones de receptor novedosas u otras interacciones de virus pueden ocurrir como un resultado de la estructura de proteína de cápside mutada, particularmente tomando como objetivo células epiteliales o endoteliales e induciendo resistencia a vacunas. La circulación endarterial de la piel y las poblaciones celulares inmunes locales únicas (particularmente las células dendríticas capaces de segregar TNF-α) pueden proporcionar objetivos adicionales para evaluación adicional de interacciones VS-FCV-huésped.
- 25

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunogénica para su uso en inmunización contra una infección viral causada por un calicivirus sistémico virulento (VS-FCV), en la que dicha composición inmunogénica comprende una cantidad inmunológicamente efectiva de un VS-FCV atenuado seleccionado de FCV-Kaos depositado con el Número de Acceso de la ATCC PTA-5798 y FCV-Ari depositado con el Número de Acceso de la ATCC PTA-5797 y un vehículo fisiológicamente aceptable, y en la que el VS-FCV no atenuado causa un síndrome de fiebre hemorrágica altamente contagioso en gatos con síntomas seleccionados de fiebre alta, edema, ulceración, pérdida del pelo, descarga nasal y ocular, anorexia, depresión y muerte, y en la que el tratamiento de dichos gatos con una dosis inmunológicamente efectiva de FCV-F9 no logra sustancialmente protección alguna contra infección con VS-FCV.
- 5 2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, que comprende adicionalmente un coadyuvante.
3. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, en la que dicho VS-FCV es matado.
4. La composición inmunogénica de cualquier reivindicación precedente para usar como un producto farmacéutico.
- 10 5. La composición inmunogénica según cualquier reivindicación precedente, que es para administración oronasal, subcutánea y/o intramuscularmente.
- 15 6. Un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEC. ID. N.º: 2 o SEC. ID. N.º: 3.

		351				400
SEC ID N.º: 1	GNYRWSDITD	FVIRPFVFOA	NRHFDFNQET	AGWSTPRFRP	ISVTITEQNG	
SEC ID N.º: 2	GNRHWTDITG	FVIRPFVFOA	NRHFDFNQET	AGWSSPRFRP	ISINISVEKA	
SEC ID N.º: 3	GNRHWTDITD	FVIRPFVFOA	NRHFDFNQET	AGWSTPRYRP	MTINISQKKG	
SEC ID N.º: 4	GNRFWSDITD	FVIRPFVFOA	NRHFDFNKET	AGWSTPRFRP	ITVTISQKEG	
		401				450
SEC ID N.º: 1	AKLGIGVATD	YIVPGIPDGW	PDTTIPGELI	PAGDYAITNG	TGNDITTATG	
SEC ID N.º: 2	AKLGTGVATD	YIVPGIPDGW	PDTTIPEKLT	PAGDYAIVCG	SGNDITTKDK	
SEC ID N.º: 3	ERLGIGIATD	YIVPGIPDGW	PDTTIPEELT	PAGDYAIVNG	T.SDIATKAQ	
SEC ID N.º: 4	EMLGIGVATD	YIVPGIPDGW	PDTTIPNKLI	PAGDYAITNQ	SGNDIQTKEE	
		451				500
SEC ID N.º: 1	YDTADIIKNN	TNFRGMYICG	SLQRAWGDKK	ISNTAFITTA	TLDGDNNNKI	
SEC ID N.º: 2	YESADVIKNN	TNFRGMYICG	SLQRAWGDKK	ISNTAFITTG	TVK...DNSI	
SEC ID N.º: 3	YEAATIIITNN	TNFKSMYICG	SLQRAWGDKK	ISNTAFITTG	KVEG...NKI	
SEC ID N.º: 4	YESAMIISNN	TNFKSMYICG	SLQRAWGNKK	VSNTAFITTA	TVK...ENKL	
		501				550
SEC ID N.º: 1	NPCNTIDQSK	IVVFQDNHVG	KKAQTSDDTL	ALLGYTGIGE	QAIGSDRDRV	
SEC ID N.º: 2	IPSNTIDQTK	ITVFQDTHVG	HDPQTSDDTL	ALLGYTGIGE	EAIGADRDRV	
SEC ID N.º: 3	TPSNKIDPTM	IAVFQDNHVN	LEVQTSDVTL	ATLGYTGIGE	EAIGADREKV	
SEC ID N.º: 4	IPSNTIDQTK	IAIFQDNHVN	RDVQTSDDTL	ALLGYTGIGE	EAIGADREKV	
		551				600
SEC ID N.º: 1	VRISTLPETG	ARGGNHPIFY	KNSIKLGYVI	RSIDVFNSQI	LHTRSQLSLN	
SEC ID N.º: 2	VRISVLPETG	ARGGNHPIFY	RNSIKLGYVL	KDIDVFNSQI	LHTRSKQLSLN	
SEC ID N.º: 3	VRISVLPETG	ARGGNHPIYY	KNKMKLGYVI	DGIDVFNSQI	LHTRSQLSLN	
SEC ID N.º: 4	VRIGVLPETG	ARGGNHPIFY	RNSMKLGYVI	KSIDVFNSQI	LHTRSQLSLN	
		601				650
SEC ID N.º: 1	HYLLPPDSFA	VYRIIDSNGS	WFDIGIDSDG	FSFVGVSGFG	KLEFPLSASY	
SEC ID N.º: 2	HYLLSPDSFA	VYRITDSNGS	WFDIGIDNDG	FSFVGVSYIG	NLEFPLTASY	
SEC ID N.º: 3	NYLLPPDSFA	VYRITDANGS	WFDIGIDSDG	FSFVGVSSIG	KLISPLSASY	
SEC ID N.º: 4	NYLLSPDSFA	VNPTIDSNGS	WWSIGSDIDS	RILVNVSTRG	KKEFPLRSFC	
		651		671		
SEC ID N.º: 1	MGIQLAKIRL	ASNIRSPMTK	L			
SEC ID N.º: 2	MGIQLAKIRL	ASNIRSGMVK	I			
SEC ID N.º: 3	MGIQLAKIRL	ASNIRSSMTK	L			
SEC ID N.º: 4	SENQSGKIRS	ASFIKTTRSK	L			

FIGURA 1 (CONTINUACIÓN)