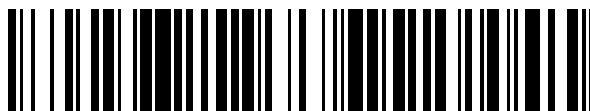


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 750**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05789769 .6**

96 Fecha de presentación: **23.09.2005**

97 Número de publicación de la solicitud: **1799253**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **27.06.2007**

54 Título: **VACUNAS MULTIVALENTES CANINAS CONTRA LEPTOSPIRA BRATISLAVA Y OTROS PATÓGENOS.**

30 Prioridad:
06.10.2004 US 959757

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.12.2011

73 Titular/es:
**PFIZER PRODUCTS INC.
EASTERN POINT ROAD
GROTON, CT 06340, US**

72 Inventor/es:
**FRANTZ, Joseph,c/o Pfizer Inc.;
NEWBY, Thomas Jack,c/o Pfizer Inc. y
TUCKER, Cassius McAllister,c/o Pfizer Global
R&D**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 370 750 T3

DESCRIPCIÓN

Vacunas multivalentes caninas contra *Leptospira bratislava* y otros patógenos

Campo de la invención

La presente invención se refiere a vacunas que contienen *Leptospira bratislava* y al uso de las mismas para proteger a los perros contra infecciones causadas por *Leptospira bratislava*. La presente invención también se refiere a vacunas de combinación que contienen *Leptospira bratislava* y uno o más antígenos de otro patógeno canino, tal como el virus del moquillo canino (CD), el adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), el virus de la parainfluenza canina (CPI), el coronavirus canino (CCV), el parvovirus canino (CPV), *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* o *Leptospira pomona*. La presente invención se refiere adicionalmente a una combinación de vacunas de dichos antígenos sin *Leptospira Bratislava*. También se proporcionan procedimientos para proteger a los perros contra enfermedades producidas por patógenos caninos usando las vacunas de combinación.

Antecedentes de la invención

El actual producto de vacuna canina contra *Bordetella bronchiseptica* disponible comercialmente está compuesto por una bacterina de células enteras de *Bordetella bronchiseptica* inactivada no adyuvada. Dicha bacterina de células enteras puede producir reacciones posvacunación relacionadas con las proteínas celulares. La proteína p68 de *B. bronchiseptica* es antigénicamente similar a la proteína de membrana externa (PME) de *B. pertussis* y a la PME de *B. parapertussis* (Shahin y col., "Characterization of the Protective Capacity and Immunogenicity of the 69-kD Outer Membrane Protein of *Bordetella pertussis*", J. Exp. Med., 171: 63-73, 1990). Se ha demostrado una función protectora de esta PME para ratones (Shahin y col., supra; Novotny y col., "Biologic and Protective Properties of the 69-kD Outer Membrane Protein of *Bordetella pertussis*: A Novel Formulation for a Cellular Pertussis vaccine", J. Infect. Dis. 164:114-22, 1991), seres humanos (He y col., "Protective Role of Immunoglobulin G Antibodies to Filamentous Hemagglutinin and Pertactin of *Bordetella pertussis* in *Bordetella parapertussis* Infection", Eur. J Clin Microbiol Infect Dis. 10:793-798, 1996) y cerdos (Kobisch y col., "Identification of a 68-Kilodalton Outer Membrane Protein as the Major Protective Antigen of *Bordetella bronchiseptica* by Using Specific-Pathogen-Free Piglets", Infect. Immun. 58(2):352-357, 1990).

El CD es una enfermedad vírica universal con manifestaciones variables que tiene una mortalidad elevada. Aproximadamente el 50 % de los perros no vacunados no inmunes infectados con el virus CD desarrolla signos clínicos y aproximadamente el 90 % de dichos perros muere.

La hepatitis canina infecciosa o ICH, causada por el adenovirus canino de tipo 1 (CAV-1) es una enfermedad vírica universal, en ocasiones mortal, de perros que se caracteriza por lesiones hepáticas y endoteliales generalizadas. El CAV-2 produce enfermedad respiratoria, que, en los casos graves, puede incluir neumonía y bronconeumonía.

El CPI es una frecuente enfermedad vírica de las vías respiratorias superiores. La CPI sin complicaciones puede ser leve o subclínica, en la que los signos se convierten en más graves si existe una infección concurrente con otros patógenos respiratorios.

La infección por CPV tiene como resultado una enfermedad entérica que se caracteriza por un inicio repentino de vómitos y diarrea, a menudo hemorrágica. Habitualmente los signos clínicos se acompañan de leucopenia. Puede afectar a perros susceptibles de cualquier edad, pero la mortalidad es mayor en los cachorros. En los cachorros de 4-12 semanas de edad, el CPV puede producir, en ocasiones, miocarditis que puede dar como resultado insuficiencia cardíaca después de una enfermedad breve e inadvertida. Tras la infección, muchos perros son resistentes a la enfermedad durante un año o más. De forma similar, las perras seropositivas pueden transmitir a sus cachorros anticuerpos contra el CPV que pueden interferir en la inmunización activa de los cachorros hasta las 16 semanas de edad.

El CCV también produce enfermedad entérica en perros susceptibles de todas las edades en todo el mundo. El virus, altamente contagioso, se transmite principalmente mediante contacto directo con heces infecciosas y puede producir enteritis clínica en un plazo de 1-4 días desde la exposición. La gravedad de la enfermedad se puede agravar por la infección concurrente con otros agentes. Los principales signos de infección por CCV incluyen anorexia, vómitos y diarrea. La frecuencia de los vómitos suele disminuir en uno o dos días desde el inicio de la diarrea, pero la diarrea puede extenderse a lo largo de la infección y las heces en ocasiones pueden contener rastros de sangre. Con la infección por CCV, la mayoría de los perros permanecen afebriles y en los casos sin complicaciones no se observa leucopenia.

La leptospirosis se produce en perros de todas las edades, generalmente con una amplia gama de signos clínicos y nefritis crónica tras la infección aguda.

Se han desarrollado algunas vacunas de combinación, incluidas las comercializadas con la marca Vanguard®. El documento WO 2004/067031 describe vacunas de combinación que protegen a los perros contra *Bordetella bronchiseptica* y uno o más de otros patógenos caninos, tales como el virus CD, el CAV-2, el virus CPI, CPV, CCV y

especies de *Leptospira* tales como *L. bratislava*, *L. canicola*, *L. grippityphosa*, *L. icterohaemorrhagiae* and *L. pomona*. No obstante, no ha habido ninguna vacuna de combinación eficaz que comprenda *L. Bratislava* contra estos otros patógenos caninos pero sin *Bordetella bronchiseptica*. Un problema en el desarrollo de vacunas de combinación implica interferencia en la eficacia, a saber un fallo de uno o más antígenos en una composición de combinación para mantener o conseguir eficacia por la presencia de los demás antígenos en la composición. Se cree que es un resultado de la interferencia con un antígeno en la composición administrada a un huésped, por ejemplo un perro, en la respuesta inmunológica, antigénica de anticuerpo o protectora, tal como la inducida por el antígeno en el huésped debido a los otros antígenos presentes en la composición. No obstante, para otros huéspedes, tales como gatos, se conocen vacunas de combinación. Se cree que la interferencia de la eficacia en perros se debe a alguna peculiaridad del sistema biológico canino o debido a la reacción de los antígenos con el sistema biológico canino.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar una vacuna de combinación adecuada para administrar a perros contra *Leptospira bratislava* y uno o más patógenos caninos distintos, que no exhiba interferencia en la eficacia en caninos sin *Bordetella bronchiseptica*. Sería todavía más ventajoso si dichas vacunas de combinación son seguras para administrar a los cachorros y proporcionar protección a largo plazo.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona vacunas y procedimientos para proteger a los perros contra enfermedades causadas por patógenos caninos.

La presente invención proporciona vacunas contra *Leptospira bratislava* adecuadas para la administración a perros y capaces de proteger a los perros contra enfermedades causadas por *Leptospira bratislava*. Dichas vacunas incluyen una preparación de células de *Leptospira bratislava* y un vehículo veterinario aceptable, tal como un adyuvante.

En el presente documento también se describen procedimientos de proteger a los perros contra enfermedades causadas por *Leptospira bratislava* administrando a un perro una vacuna que incluye una preparación de células de *Leptospira bratislava* y un vehículo veterinario aceptable, tal como un adyuvante.

Una combinación preferida incluye dos o más antígenos de patógenos caninos capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora en perros contra la enfermedad causada por dicho(s) patógeno(s). Dichos patógenos se pueden seleccionar del virus del moquillo canino (CD), el adenovirus de tipo 2 (CAV-2), el virus de la parainfluenza canina (CPI), el parvovirus canino (CPV), el coronavirus canino (CCV), el herpesvirus canino, el virus de la rabia, *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjobovis*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteriodes spp.*, *Leishmania spp.*, *Borrelia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma spp.* y *Microsporium canis*.

Otra vacuna de combinación preferida incluye cepas atenuadas del virus del moquillo canino (CD), el adenovirus de tipo 2 (CAV-2), el virus de la parainfluenza canina (CPI) y el parvovirus canino (CPV); y una preparación inactivada de una cepa del coronavirus canino (CCV); y una preparación celular de cinco serovariedades de *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*.

Otra vacuna de combinación preferida incluye cepas atenuadas del virus del moquillo canino (CD), el adenovirus de tipo 2 (CAV-2), el virus de la parainfluenza canina (CPI) y el parvovirus canino (CPV); y una preparación inactivada de una cepa del coronavirus canino (CCV); y una preparación de células inactivadas de cuatro serovariedades de *Leptospira (Leptospira canicola, Leptospira grippityphosa, Leptospira icterohaemorrhagiae y Leptospira pomona)*.

Otra vacuna de combinación preferida más incluye cepas atenuadas del virus CD, el virus CAV-2, el virus CPI y una cepa de CPV.

Otra vacuna de combinación preferida incluye cepas atenuadas del virus CD, el virus CAV-2, el virus CPI, una cepa de CPV y una preparación de células inactivadas de *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Otra vacuna de combinación preferida más incluye cepas atenuadas del virus CD, el virus CAV-2, el virus CPI, una cepa de CPV y una preparación de células inactivadas de cinco serovariedades de *Leptospira (Leptospira bratislava, Leptospira canicola, Leptospira grippityphosa, Leptospira icterohaemorrhagiae y Leptospira pomona)*.

Otra vacuna de combinación preferida más incluye cepas atenuadas del virus CD, el virus CAV-2, el virus CPI, una cepa de CPV y una preparación de células inactivadas de cuatro serovariedades de *Leptospira (Leptospira canicola, Leptospira grippityphosa, Leptospira icterohaemorrhagiae y Leptospira pomona)*.

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición de vacuna para usar en la inmunización de perros contra la infección causada por *Leptospira bratislava*, que comprende una preparación celular de *Leptospira* de *Leptospira bratislava* y un vehículo. Preferentemente, dicha una preparación celular de *Leptospira* comprende además una preparación celular de al menos uno de *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* o *Leptospira pomona*, en la que la cantidad de cada cepa de

Leptospira en la composición de vacuna está en el intervalo de aproximadamente 100-3500 unidades nefelométricas por dosis de vacuna.

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una vacuna de composición para usar en la inmunización de perros contra patógenos caninos, que comprende la composición del primer aspecto y además comprende una cepa atenuada del virus del moquillo canino (CD), una cepa atenuada del adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), una cepa atenuada del virus de la parainfluenza canina (CPI), una cepa atenuada del parvovirus canino (CPV) y un vehículo, en la que la cantidad de cada cepa atenuada de virus en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 de TCID₅₀ por dosis. Preferentemente, dicha vacuna de combinación comprende además una preparación de células parciales o enteras inactivadas de una cepa del coronavirus canino (CCV). Más preferentemente, la cantidad de la preparación celular de dicha cepa de CCV en dicha vacuna es de al menos aproximadamente 100 unidades relativas por dosis.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona una vacuna de combinación para usar en la inmunización de perros contra patógenos caninos, que comprende una preparación celular de *Leptospira* de *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, y *Leptospira pomona* y que además comprende una cepa atenuada del virus del moquillo canino (CD), una cepa atenuada del adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), una cepa atenuada del virus de la parainfluenza canina (CPI), una cepa atenuada del parvovirus canino (CPV) y un vehículo. Preferentemente, dicha vacuna de combinación comprende además una preparación de células parciales o enteras inactivadas de una cepa de coronavirus canino (CCV). Más preferentemente, la cantidad de la preparación celular de dicha cepa de CCV en dicha vacuna es de al menos aproximadamente 100 unidades relativas por dosis.

Preferentemente, en el primer o tercer aspecto de la presente invención, la cantidad de cada cepa de *Leptospira* está en el intervalo de aproximadamente 100 a 3500 unidades nefelométricas por dosis.

Preferentemente, en el primero, segundo o tercer aspecto de la presente invención, la cantidad de cada cepa de *Leptospira* está en el intervalo de aproximadamente 200-2000 unidades nefelométricas por dosis.

Preferentemente, en el tercer aspecto de la presente invención, la cantidad de dicha cepa atenuada para el virus del CD en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 TCID₅₀ por dosis, la cantidad de dicha cepa atenuada del CAV-2 en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 TCID₅₀ por dosis, la cantidad de dicha cepa atenuada del virus CPI en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 TCID₅₀ por dosis y/o la cantidad de dicha cepa atenuada del CPV en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 TCID₅₀ por dosis.

También se proporciona la composición de vacuna de acuerdo con cualquiera del primero, segundo o tercer aspecto de la presente invención, en la que el vehículo comprende saponina y tensioactivo. Preferentemente, la saponina es Quil A y el tensioactivo es colesterol. Más preferentemente, la cantidad de Quil A está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis.

También se proporciona la composición de vacuna de acuerdo con cualquiera del primero, segundo o tercer aspecto de la presente invención, en la que el vehículo comprende hidróxido de aluminio.

También se proporciona además la composición de vacuna de acuerdo con cualquiera del primero, segundo o tercer aspecto de la presente invención, en la que dicha composición se administra por vía intravenosa, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea.

También se proporciona la composición de vacuna de acuerdo con cualquiera del primero, segundo o tercer aspecto de la presente invención, en la que dicho perro recibe dicha composición dos o tres veces con un intervalo de aproximadamente 24- semanas entre las administraciones.

Descripción breve de las figuras

Figura 1. Resumen de la media geométrica de los títulos finales del ELISA del p68 en perros no vacunados y vacunados frente a p68 de *Bordetella* (15 µg/dosis) con exposición a aerosol con *Bordetella bronchiseptica*.

Figura 2. Resumen de los títulos del amiloide A en suero en perros tras la exposición en aerosol a *Bordetella bronchiseptica*.

Figura 3. Resumen de la media geométrica de los títulos finales del ELISA del p68 en perros no vacunados y vacunados frente a p68 de *Bordetella* tras vacunación y exposición a aerosol con *Bordetella bronchiseptica*.

Figura 4. Resumen de los títulos del amiloide A en suero en perros tras la exposición en aerosol a *Bordetella bronchiseptica*.

Figura 5. Transferencia de tipo western que muestra la reactividad del anticuerpo monoclonal frente a p68 Bord 2-7 al lisado de células enteras p68.

Descripción detallada de la invención

En una realización, la presente solicitud describe vacunas monovalentes adecuadas para administración a perros capaces de proteger a los perros contra enfermedades causadas por *Bordetella bronchiseptica*. Las vacunas

monovalentes incluyen un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* producido de forma recombinante y un vehículo veterinario aceptable, tal como un adyuvante.

En otra realización, la presente solicitud describe procedimientos de proteger a los perros contra enfermedades causadas por *Bordetella bronchiseptica* administrando a un perro una vacuna monovalente que incluye un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* producido de forma recombinante y un vehículo veterinario aceptable, tal como un adyuvante.

En otra realización más, la presente solicitud describe vacunas de combinación adecuadas para administrar a perros. Las vacunas de combinación de la presente invención incluyen un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* producido de forma recombinante en combinación con al menos otro antígeno capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora en perros contra una enfermedad producida por dicho otro antígeno. Otra realización incluye dos o más antígenos de patógenos caninos capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora en perros contra la enfermedad causada por dicho(s) patógeno(s).

Una vacuna de combinación preferida incluye cepas atenuadas del virus del moquillo canino (CD), el adenovirus de tipo 2 (CAV-2), el virus de la parainfluenza canina (CPI) y el parvovirus canino (CPV); y una preparación inactivada de una cepa del coronavirus canino (CCV); y una preparación de cuatro serovariedades de *Leptospira* (*Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

Otra vacuna de combinación preferida incluye cepas atenuadas del virus del moquillo canino (CD), el adenovirus de tipo 2 (CAV-2), el virus de la parainfluenza canina (CPI) y el parvovirus canino (CPV); y una preparación inactivada de una cepa del coronavirus canino (CCV); y una preparación de cinco serovariedades de *Leptospira* (*Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

Otra vacuna de combinación preferida más incluye cepas atenuadas del virus CD, el virus CAV-2, el virus CPI, una cepa de CPV y una preparación de cuatro serovariedades de *Leptospira* (*Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

Otra vacuna de combinación preferida incluye cepas atenuadas del virus CD, el virus CAV-2, el virus CPI, una cepa de CCV y una preparación de *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae*.

Otra vacuna de combinación preferida más incluye cepas atenuadas del virus CD, el virus CAV-2, el virus CPI, una cepa de CPV y una preparación de cinco serovariedades de *Leptospira* (*Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*).

Para fines de claridad de la divulgación, y no a modo de limitación, la descripción detallada de la invención se divide en las subsecciones que describen o ilustran ciertas características, realizaciones o aplicaciones de la invención.

Definiciones y Abreviaturas

La expresión "proteger a un perro contra una enfermedad causada por un patógeno canino", como se usa en el presente documento significa reducir o eliminar el riesgo de infección por el patógeno, mejorar o aliviar los síntomas de una infección, o acelerar la recuperación de una infección. La protección se consigue si hay una reducción de la carga viral o bacteriana, una reducción en la diseminación viral o bacteriana, una disminución de la incidencia o duración de las infecciones, menores niveles séricos de proteínas de fase aguda, menores temperaturas rectales y/o incremento de la captación de alimento y/o crecimiento, por ejemplo.

La expresión "antígeno p68" se refiere a una proteína con un peso molecular de 68 kDa determinado mediante electroforesis en gel de SDS poliacrilamida que es reconocida por el anticuerpo monoclonal específico de p68 Bord 2-7 (n° ATCC) y que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEC ID N° 1 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la SEC ID N° 1.

Por "sustancialmente idéntica" se quiere decir un grado de identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90 %, preferentemente de al menos aproximadamente 95 % o, más preferentemente, de al menos aproximadamente 98 %.

La expresión "vacuna monovalente", como se usa en el presente documento, se refiere a una vacuna que tiene un componente antigénico principal. Por ejemplo, una vacuna monovalente de p68 incluye un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* como el componente antigénico principal de la vacuna y es capaz de proteger al animal al que se administra la vacuna contra enfermedades causadas por *Bordetella bronchiseptica*. Otro ejemplo de una vacuna monovalente incluye una preparación de células de *Leptospira bratislava* como el componente antigénico principal de la vacuna y es capaz de proteger al animal al que se administra la vacuna contra enfermedades causadas por *Leptospira bratislava*.

La expresión "vacuna de combinación" quiere decir una combinación bivalente o multivalente de antígenos que son capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora en perros. Los efectos protectores de una vacuna de combinación contra un patógeno o patógenos normalmente se consiguen induciendo en el animal sujeto una

respuesta inmunitaria, una respuesta inmunitaria bien celular o bien humoral, o una combinación de ambas.

Con "inmunogénico" se quiere decir la capacidad de una composición para provocar una respuesta inmunitaria en perros contra un patógeno concreto. La respuesta inmunitaria puede ser una respuesta inmunitaria celular mediada principalmente por linfocitos T citotóxicos y linfocitos T productores de citocinas, o una respuesta inmunitaria humoral mediada principalmente por linfocitos T colaboradores, que, a su vez, activan los linfocitos B que conducen a la producción de anticuerpos.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad de una vacuna monovalente o de combinación suficiente para producir una respuesta inmunitaria protectora en el perro al que se le administra. La respuesta inmunitaria puede comprender, sin limitaciones, la inducción de inmunidad celular y/o humoral. La cantidad de una vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo del antígeno concreto usado en la vacuna, la edad y la afección del perro y/o el grado de infección, y puede ser determinada por un médico veterinario.

Vacunas de p68

La presente solicitud divulga que una composición de vacuna que contiene un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* protege con eficacia a los perros contra la enfermedad causada por *Bordetella bronchiseptica*. La composición de vacuna no produce reacciones posvacunales significativas, es segura para administrar a cachorros e induce inmunidad protectora en perros que dura un periodo prolongado de tiempo.

De acuerdo con esto, la solicitud divulga una composición de vacuna que contiene un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica* (o "una vacuna de p68") que es adecuado para administrar a los perros y que es capaz de proteger a los perros contra la enfermedad causada por *Bordetella bronchiseptica*, por ejemplo la traqueobronquitis infecciosa ("tos de las perreras").

Para los fines de la presente invención, la expresión "antígeno p68" se refiere a una proteína (véase la figura 5) con un peso molecular de 68 kDa determinado mediante electroforesis en gel de SDS poliacrilamida que es reconocida por el anticuerpo monoclonal específico de p68 Bord 2-7 (nº ATCC) y que tiene una secuencia de aminoácidos tal como se indica en la SEC ID Nº 1 o una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente idéntica a la SEC ID Nº 1. Por "sustancialmente idéntica" se quiere decir un grado de identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90 %, preferentemente de al menos aproximadamente 95 %, o, más preferentemente, de al menos aproximadamente 98 %. Un ejemplo de un antígeno p68 que tiene una secuencia de aminoácidos sustancialmente idéntica a la SEC ID Nº 1 es el antígeno p68 descrito en el documento WO 92/17587, que se indica en la SEC ID Nº 3. El anticuerpo monoclonal específico de p68 de la presente invención reconoce proteínas p68 nativas, proteínas p68 recombinantes y proteínas p68 sobre la superficie de las bacterias, por ejemplo.

Los antígenos p68 adecuados para usar incluyen proteínas p68 nativas (es decir, proteínas p68 naturales purificadas de *Bordetella bronchiseptica*) y proteínas p68 producidas de forma recombinante.

La purificación de p68 nativo de *Bordetella bronchiseptica* se describe en, por ejemplo, Montaraz y col., Infection and Immunity 47: 744-751 (1985) y también se ilustra en los ejemplos que se proporcionan a continuación en el presente documento. La producción recombinante de p68 se puede conseguir usando una cualquiera de las técnicas de expresión recombinante y de clonación molecular conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede introducir una molécula de ácido nucleico que codifica p68 en una célula huésped adecuada, tal como una bacteria, una célula de levadura (p. ej., una célula de *Pichia*), una célula de insecto o una célula de mamífero (p. ej., una célula CHO). La molécula de ácido nucleico que codifica p68 se puede introducir en un enlace operable a un promotor capaz de efectuar la expresión del antígeno p68 en la célula huésped. p68, que se expresa en la célula huésped, se puede expresar fácilmente usando técnicas de purificación proteica rutinarias.

En una realización preferida, la secuencia de nucleótidos como se indica en la SEC ID Nº: 2 que codifica el antígeno p68 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID Nº 1, se clona en un vector de expresión y se introduce en un enlace operable a un promotor sensible a la temperatura. El vector de expresión se introduce en *Escherichia coli* y el antígeno p68 se expresa tras la inducción de calor. Las células se lisan y los cuerpos de inclusión en los que se acumula el antígeno p68 se separan mediante centrifugación. El p68 recombinante en los cuerpos de inclusión se solubiliza usando SDS u otros agentes de solubilización conocidos en la técnica, tales como urea, guanidina clorhidrato, colato sódico, taurocolato y desoxicolato sódico. De acuerdo con la presente invención, una proteína p68 nativa o recombinante purificada se combina con un vehículo veterinario aceptable para formar una composición de vacuna de p68.

La expresión "vehículo veterinario aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina, entre otros.

Adyuvantes adecuados para usar de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otros, varias clases de

adyuvantes tales como sales minerales, por ejemplo alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio; agentes de superficie activa y micropartículas, por ejemplo tensioactivos de polímeros de bloque no iónicos (p. ej., colesterol), virosomas, saponinas (p. ej., Quil A, QS-21 and GPI-0100), proteosomas, complejos estimulantes inmunitarios, cocleatos, aminos cuaternarios (bromuro de dimetildioctadecil amónico (DDA)), avridina, vitamina A, vitamina E; productos bacterianos tales como el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), esqueleto de la pared celular de *Mycobacterium phlei* (Detox®), dipéptidos (MDP) y tripéptidos (MTP) de muramilo, lípido monofosforilo A, bacilo de Calmete-Guerin, enteroxinas termolábiles de *E. coli*, toxina del cólera, dimicolato de trehalosa, oligodesoxinucleótidos de CpG; citocinas y hormonas, p. ej., interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, deshidroepiandrosterona, 1, 25-dihidroxi vitamina D₃; polianiones, por ejemplo dextrano; poliacrílicos (p. ej., polimetilmetacrilato, Carbopol 934P); vehículos, por ejemplo toxoide del tétanos, toxoide diftérico, subunidad B de la toxina del cólera, enterotoxina mutante termolábil de *E. coli* enterotoxigénica (rmlt), proteínas del shock térmico; emulsiones de aceite en agua, por ejemplo AMPHIGEN® (Hydronics, USA); y emulsiones de agua en aceite, tales como, por ejemplo, adyuvantes completos e incompletos de Freund.

Adyuvantes preferidos para usar en las vacunas de la presente invención incluyen Quil A y colesterol.

El antígeno p68 y el vehículo veterinario aceptable se pueden combinar de cualquier modo conveniente y práctico para formar una composición de vacuna, por ejemplo mediante mezcla, solución, suspensión, emulsificación, encapsulación, absorción y similares, y se puede constituir en formulaciones tales como comprimidos, cápsulas, polvo, jarabe, suspensiones que son adecuadas para inyecciones, implantaciones, inhalaciones, ingestiones o similares. Preferentemente, la vacuna se formula de tal modo que se puede administrar a los perros mediante inyección en una dosis de aproximadamente 0,1 a 5 ml, o, preferentemente, aproximadamente 0,5 a 2,5 ml, o incluso más preferentemente, en una dosis de aproximadamente 1 ml. Cuando sea adecuado, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se deben esterilizar mediante procedimientos bien conocidos.

La cantidad de p68 en las vacunas deberá ser eficaz para inmunización y, en general, está en el intervalo de 0,5 a 1000 µg por dosis. Preferentemente, la cantidad de p68 está en el intervalo de 1-260 µg por dosis. Más preferentemente, la cantidad de p68 está en el intervalo de 10-100 µg por dosis. Incluso más preferentemente, la cantidad de p68 es de aproximadamente 15 a 25 µg por dosis.

La cantidad de adyuvantes adecuada para usar en las vacunas depende de la naturaleza del adyuvante usado. Por ejemplo, cuando Quil A y colesterol se usan como adyuvante, Quil A está, en general, en una cantidad de aproximadamente 1-1000 µg por dosis, preferentemente 30-100 µg por dosis y, más preferentemente, aproximadamente 50-75 µg por dosis; y el colesterol está, en general, en una cantidad de aproximadamente 1-1000 µg por dosis, preferentemente 30-100 µg por dosis y, más preferentemente, aproximadamente 50-75 µg por dosis.

En otra realización, la solicitud describe procedimientos de proteger perros contra la enfermedad causada por *Bordetella bronchiseptica* administrando a un perro una composición de vacuna de p68, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. La composición de vacuna de p68 proporciona a los perros una inmunidad a largo plazo durante al menos aproximadamente 4 meses, preferentemente durante al menos aproximadamente 6 meses o, incluso más preferentemente, durante aproximadamente un año, la vacuna de p68 puede administrarse a un perro por cualquier vía conocida, incluidas las vías oral, intranasal, mucosa, tópica, transdérmica y parenteral (p. ej., intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o intramuscular). La administración también se puede realizar usando dispositivos de liberación sin agujas. La administración se puede realizar usando una combinación de vías, por ejemplo primera administración usando una vía parental y la posterior administración usando una vía mucosa.

Las vías de administración preferidas incluyen las administraciones subcutánea e intramuscular.

La composición de la vacuna con p68 se puede administrar a perros de al menos 6 semanas de edad, preferentemente de al menos 7 semanas de edad y, más preferentemente, de al menos 8 o 9 semanas de edad. Los perros pueden vacunarse con una dosis o más de una dosis de una vacuna de p68. Preferentemente se administran a los perros dos dosis de una vacuna de p68 con un intervalo de aproximadamente 2-4 semanas, preferentemente aproximadamente 3 semanas, entre las dos administraciones. Si se vacuna a los perros antes de los 4 meses de edad se recomienda que se les vuelva a vacunar con una única dosis después de los 4 meses de edad, ya que los anticuerpos de la madre pueden interferir en el desarrollo de una respuesta inmunitaria adecuada en cachorros menores de 4 meses de edad. Se puede volver a vacunar a los perros anualmente con una única dosis. Cuando es probable la exposición a *B. bronchiseptica*, como en situaciones de cría, residencias o exhibición, se puede administrar un refuerzo adicional en un plazo de 1 año o, preferentemente, de 6 meses, tras la aparición de estos acontecimientos.

Vacunas de combinación

En otra realización, la presente solicitud describe vacunas de combinación y procedimientos para proteger a los perros contra *Bordetella bronchiseptica* y/o uno o más de otros patógenos administrando dichas vacunas de combinación. Las composiciones de la vacuna de combinación de la presente invención no muestran interferencia

en la eficacia y son seguras para administrar a cachorros.

Las vacunas de combinación incluyen el antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica*, que se puede producir como se ha descrito anteriormente en el presente documento, en combinación con al menos un antígeno de otros patógenos caninos capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora en perros contra una enfermedad producida por dichos otros patógenos. Dichas vacunas de combinación también incluyen combinaciones de dos o más de otros patógenos caninos sin el antígeno p68.

Dichos otros patógenos incluyen, entre otros, el virus del moquillo canino (CD), el adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), el virus de la parainfluenza canina (CPI), el parvovirus canino (CPV), el coronavirus canino (CCV), el herpesvirus canino y el virus de la rabia. Antígenos de estos patógenos para usar en las composiciones de vacuna pueden estar en forma de una preparación de virus vivos modificados o una preparación de virus inactivados. En la técnica se conocen procedimientos de atenuar cepas virulentas de estos virus y procedimientos de fabricar una preparación de virus inactivados y se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 4.567.042 y 4.567.043.

Otros patógenos también incluyen *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippityphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjobovis*, *Porphyromonas spp.*, *Bacteriodes spp.*, *Leishmania spp.*, *Borrelia spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Mycoplasma ssp.* y *Microsporium canis*. Los antígenos de estos patógenos para usar en las composiciones de vacuna pueden estar en forma de una preparación de células enteras o parciales inactivadas usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la técnica se conocen los procedimientos de fabricación de una preparación de células enteras o parciales de *Leptospira* inactivadas y se describen en, por ejemplo, Yan, K-T, "Aspects of Immunity to *Leptospira borgpetersenii* serovar hardjo", PhD Thesis, Appendix I, 1996. Faculty of Agriculture and Food Science, The Queen's University of Belfast; Mackintosh y col., "The use of a hardjo-pomona vaccine to prevent leptospirosis in cattle exposed to natural challenge with *Leptospira interrogans* serovar hardjo", New Zealand Vet. J. 28:174-177, 1980; Bolin y col., "Effect of vaccination with a pentavalent leptospiral vaccine on *Leptospira interrogans* serovar hardjo type hardjo-bovis infection of pregnant cattle", Am. J. Vet. Res. 50:161-165, 1989.

De acuerdo con la presente invención, las vacunas de combinación generalmente incluyen un vehículo veterinario aceptable. Como se ha descrito anteriormente en el presente documento, un vehículo veterinario aceptable incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro sódico, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros. Los estabilizantes incluyen albúmina, entre otros.

Adyuvantes adecuados para usar de acuerdo con la presente invención incluyen, entre otros, varias clases de adyuvantes tales como sales minerales, por ejemplo alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio y fosfato de calcio; agentes de superficie activa y micropartículas, por ejemplo tensioactivos de polímeros de bloque no iónicos (p. ej., colesterol), virosomas, saponinas (p. ej., Quil A, QS-21 and GPI-0100), proteosomas, complejos estimulantes inmunitarios, coqueatos, aminos cuaternarios (bromuro de dimetildioctadecil amónico (DDA)), avridina, vitamina A, vitamina E; productos bacterianos tales como el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.), esqueleto de la pared celular de *Mycobacterium phlei* (Detox®), dipéptidos (MDP) y tripéptidos (MTP) de muramilo, lípido monofosforilo A, bacilo de Calmette-Guerin, enterotoxinas termolábiles de *E. coli*, toxina del cólera, dimicolato de trehalosa, oligodesoxinucleótidos de CpG; citocinas y hormonas, p. ej., interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-18), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, deshidroepiandrosterona, 1, 25-dihidroxi vitamina D₃; polianiones, por ejemplo dextrano; poliacrílicos (p. ej., polimetilmetacrilato, Carbopol 934P); vehículos, por ejemplo toxoide del tétanos, toxoide diftérico, subunidad B de la toxina del cólera, enterotoxina mutante termolábil de *E. coli* enterotoxigénica (rmlT), proteínas del shock térmico; emulsiones de aceite en agua, por ejemplo AMPHIGEN® (Hydronics, USA); y emulsiones de agua en aceite, tales como, por ejemplo, adyuvantes completos e incompletos de Freund.

Adyuvantes preferidos para usar en las vacunas de combinación de acuerdo con la presente invención incluyen 1) Quil A más colesterol y 2) hidróxido de aluminio. La cantidad de adyuvantes adecuada para usar en las vacunas depende de la naturaleza del adyuvante usado. Por ejemplo, cuando Quil A y colesterol se usan como adyuvante, Quil A está, en general, en una cantidad de aproximadamente 1-1000 µg por dosis, preferentemente 30-100 µg por dosis y, más preferentemente, aproximadamente 50-75 µg por dosis; y el colesterol está, en general, en una cantidad de aproximadamente 1-1000 µg por dosis, preferentemente 30-100 µg por dosis y, más preferentemente, aproximadamente 50-75 µg por dosis. Cuando se usa hidróxido de aluminio como adyuvante, en general está en una cantidad de aproximadamente 0,5-20 %, preferentemente aproximadamente 0,5-10 % y, más preferentemente, aproximadamente 1-2 %.

El antígeno p68, uno o más antígenos de otros patógenos y/o el vehículo veterinario aceptable se pueden combinar de cualquier modo conveniente y práctico para formar una composición de vacuna de combinación, por ejemplo mediante mezcla, solución, suspensión, emulsificación, encapsulación, absorción y similares, y se puede constituir en formulaciones tales como comprimidos, cápsulas, polvo, jarabe, suspensiones que son adecuadas para inyecciones, implantaciones, inhalaciones, ingestiones o similares. Preferentemente, la vacuna se formula de tal

modo que se puede administrar a los perros mediante inyección en una dosis de aproximadamente 0,1 a 5 ml, o, preferentemente, aproximadamente 0,5 a 2,5 ml, o incluso más preferentemente, en una dosis de aproximadamente 1 ml.

Las vacunas de combinación se pueden preparar rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas (o una preparación fabricada mediante otros procedimientos tales como liofilización o desecación) y una preparación viral con una preparación líquida, en la que la preparación líquida está compuesta por los antígenos de *Leptospira* disueltos en solución salina estéril y adyuvada con Quil A y colesterol. Dicha vacuna de combinación también se pueden preparar rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas y una preparación viral de *Leptospira* (o una preparación fabricada mediante otros procedimientos tales como liofilización o desecación) con una solución estéril o rehidratando dicha preparación liofilizada con CCV más diluyente.

De acuerdo con la presente invención se puede administrar vacunas de combinación a perros de al menos 6 semanas de edad, preferentemente de al menos 7 semanas de edad y, más preferentemente, de al menos 8 o 9 semanas de edad. Las vacunas de combinación se pueden administrar en de 2 a 4 dosis, preferentemente en de 2 a 3 dosis. Las dosis se pueden administrar con de 2 a 6 semanas entre cada dosis, preferentemente con de 2 a 4 semanas entre cada dosis.

La administración se puede realizar por cualquier vía conocida, incluidas las vías intranasal, mucosa, tópica, transdérmica y parenteral (p. ej., intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, subcutánea o intramuscular). La administración también se puede realizar usando dispositivos de liberación sin agujas. La administración también se puede realizar usando una combinación de vías, por ejemplo primera administración usando una vía parental y la posterior administración usando una vía mucosa. Las vías de administración preferidas incluyen las administraciones subcutánea e intramuscular.

Vacunas de combinación preferidas y procedimientos de vacunación

Una vacuna de combinación preferida incluye una cepa atenuada del virus CD, una cepa atenuada de CAV-2, una cepa atenuada del virus CPI, una cepa atenuada de CPV, una preparación inactivada de una cepa de CCV y un antígeno p68 de *Bordetella bronchiseptica*.

Una vacuna de combinación especialmente preferida incluye la cepa atenuada del virus CD designada la cepa "Snyder Hill" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa atenuada de CAV-2 designada cepa "Manhattan" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa atenuada del virus CPI, que tiene la designación "NLCPI-5" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa atenuada de CPV que tiene la designación "NL-35-D" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), una preparación inactivada de la cepa de CCV que tiene la designación "NL-18" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA) y el antígeno p68 recombinante de *Bordetella bronchiseptica* que tiene la secuencia de SEC ID N° 1. Dicha vacuna de combinación, también denominada en el presente documento "vacuna de combinación p68/5CV-2" se prepara, preferentemente, rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas y la preparación viral con una preparación líquida, en la que la preparación líquida está compuesta por el antígeno p68 disuelto en solución salina estéril y adyuvado con Quil A y colesterol. Esta combinación sin el antígeno p68 se denomina en el presente documento combinación 5 CV. Dicha vacuna de combinación se prepara, preferentemente, rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas y la preparación viral con una preparación líquida, en la que la preparación líquida está compuesta por solución salina estéril y adyuvada con Quil A y colesterol.

Otra vacuna de combinación especialmente preferida incluye los componentes antigénicos de la vacuna de combinación p68/5CV, así como preparaciones de células enteras inactivadas de cinco especies de *Leptospira*: *Leptospira bratislava* (p. ej., una cepa de *Leptospira bratislava* que se puede obtener en National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), *Leptospira canicola* (p. ej., la cepa C-5, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), *Leptospira grippotyphosa* (p. ej., la cepa MAL 1540, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA.), *Leptospira icterohaemorrhagiae* (p. ej., la cepa NADL 11403, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA) y *Leptospira pomona* (p. ej., la cepa T 262, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA). Dicha vacuna de combinación, también denominada en el presente documento "vacuna de combinación p68/5CV-*Leptospira*" se prepara, preferentemente, rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas (o una preparación fabricada mediante otros procedimientos, tales como liofilización o desecación) y la preparación viral con una preparación líquida, en la que la preparación líquida está compuesta por los antígenos de *Leptospira* disueltos en solución salina estéril y adyuvada con Quil A y colesterol. Esta combinación sin el antígeno p68 se denomina en el presente documento combinación 5CV-5*Leptospira*. Esta combinación si el antígeno p68 y si n *Leptospira bratislava* se denomina en el presente documento combinación 5CV-4*Leptospira*. La combinación 5CV sin el antígeno p68 y con *Leptospira canicola* y *Leptospira icterohaemorrhagiae* se denomina en el presente documento combinación 5CV-2*Leptospira*. Dichas vacunas de combinación se preparan, preferentemente, rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas (o una preparación fabricada mediante otros procedimientos tales como liofilización o desecación) y una preparación viral con una preparación líquida, en la que la preparación líquida está compuesta por los antígenos de *Leptospira* disueltos en solución salina estéril y adyuvada con Quil A y colesterol. Dichas vacunas de combinación también se preparan, preferentemente, rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas y una preparación viral de *Leptospira* (o una

preparación fabricada mediante otros procedimientos tales como liofilización o desecación) con una solución estéril o rehidratando dicha preparación liofilizada con CCV más diluyente.

Las vacunas de combinación p68/SCV, p68/5CV-Leptospira, 5C V, 5C V-5Leptospira, 5CV-4Leptospira y 5CV-2Leptospira se pueden administrar a perros sanos de 4 semanas de edad o mayores, preferentemente de 6 semanas de edad o mayores y, preferentemente, en 3 dosis, cada una administrada separadas por 3 semanas. Se puede volver a vacunar a los perros anualmente con una única dosis. Cuando es probable la exposición a *B. bronchiseptica* y/o virus canino como en situaciones de cría, residencias o exhibición, se puede administrar un refuerzo adicional en un plazo de 1 año o, preferentemente, de 6 meses, tras la aparición de estos acontecimientos.

Otra vacuna de combinación preferida más incluye una cepa atenuada del virus CD, una cepa atenuada de CAV-2, una cepa atenuada del virus CPI, una cepa atenuada de CPV y un antígeno p68 recombinante de *Bordetella bronchiseptica*.

Una vacuna de combinación especialmente preferida incluye la cepa atenuada del virus CD designada la cepa "Snyder Hill" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa atenuada de CAV-2 designada cepa "Manhattan" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa atenuada del virus CPI, que tiene la designación del "NLCPI-5" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA), la cepa atenuada de CPV designada "NL-35-D" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA) y el antígeno p68 recombinante de *Bordetella bronchiseptica* que tiene la secuencia de SEC ID N° 1. Dicha vacuna de combinación, también denominada en el presente documento "vacuna de combinación p68/DA₂PP" se prepara, preferentemente, rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas (o una preparación fabricada mediante otros procedimientos, tales como liofilización o desecación) con una preparación líquida, en la que la preparación líquida está compuesta por el antígeno p68 disuelto en solución salina estéril y adyuvado con Quil A y colesterol. Esta vacuna de combinación sin el antígeno p68 se denomina en vacuna de combinación DA₂PP. Dicha vacuna de combinación se prepara, preferentemente, rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas (o una preparación fabricada mediante otros procedimientos tales como liofilización o desecación) con una preparación líquida, en la que la preparación líquida está compuesta por solución salina estéril y adyuvada con Quil A y colesterol.

Otra vacuna de combinación especialmente preferida incluye los componentes antigénicos de la vacuna de combinación p68/DA₂PP, así como preparaciones de células enteras inactivadas de cinco especies de *Leptospira*: *Leptospira canicola* (p. ej., la cepa C-51, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA) y *Leptospira icterohaemorrhagiae* (p. ej., la cepa, NADL 11 403, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA). Como alternativa, una vacuna de combinación preferida puede incluir los componentes antigénicos de la vacuna de combinación p68/DA₂PP, así como preparaciones de células enteras inactivadas de cinco especies de *Leptospira*: *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*. Estas vacunas de combinación, también denominada en el presente documento "vacuna de combinación p68/DA₂PP-Leptospira" se preparan, preferentemente, rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas (o una preparación fabricada mediante otros procedimientos, tales como liofilización o desecación) y la preparación viral con una preparación líquida, en la que la preparación líquida está compuesta por el antígeno p68 y antígenos de *Leptospira*, disueltos en solución salina estéril y adyuvado con Quil A y colesterol.

Como alternativa, otra vacuna de combinación preferida incluye los componentes antigénicos de la vacuna de combinación DA₂PP, así como preparaciones de células enteras inactivadas de cinco especies de *Leptospira*: *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*. Otra vacuna de combinación preferida incluye los componentes antigénicos de la vacuna de combinación DA₂PP, así como preparaciones de células enteras inactivadas de cuatro especies de *Leptospira*: *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* y *Leptospira pomona*. Estas vacunas de combinación, también denominadas en el presente documento "vacunas de combinación DA₂PP-Leptospira" se preparan, preferentemente, rehidratando una preparación liofilizada de las cepas virales atenuadas (o una preparación fabricada mediante otros procedimientos, tales como liofilización o desecación) y la preparación viral con una preparación líquida, en la que la preparación líquida está compuesta por los antígenos de *Leptospira*, disueltos en solución salina estéril y adyuvado con Quil A y colesterol.

De acuerdo con la presente divulgación, las vacunas de combinación p68/DA₂PP, p68/DA₂PP-Leptospira, DA₂PP, y DA₂PP-Leptospira se pueden administrar a perros sanos de 6 semanas de edad o mayores o, preferentemente, de 8 semanas de edad o mayores y, preferentemente, en 2 dosis, cada una administrada separadas por 3 semanas. Una única dosis puede ser suficiente si se administra a un perro de al menos 12 semanas de edad. Se puede volver a vacunar a los perros anualmente con una única dosis. Cuando es probable la exposición a *B. bronchiseptica* y/o virus canino como en situaciones de cría, residencias o exhibición, se puede administrar un refuerzo adicional en un plazo de 1 año o, preferentemente, de 6 meses, tras la aparición de estos acontecimientos. Otra vacuna de combinación preferida incluye un antígeno p68, preferentemente el antígeno p68 recombinante que tiene la SEC ID N° 1, en combinación con una cepa atenuada de CPI.

Otra vacuna de combinación preferida más incluye un antígeno p68, preferentemente el antígeno p68 recombinante que tiene la SEC ID N° 1, una cepa atenuada de CPI y al menos dos especies de *Leptospira*, tales como *Leptospira*

canicola (p. ej., la cepa C-51, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA) y *Leptospira icterohaemorrhagiae* ((p. ej., la cepa, NADL 11403, National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

La cantidad del antígeno p68 y el(los) antígeno(s) de uno o más de otros patógenos en las vacunas de combinación debe ser eficaz en la inmunización. En general, el antígeno p68 en una vacuna de combinación deberá estar en una cantidad de al menos aproximadamente 0,5 µg por dosis. El virus de CD atenuado deberá estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 a aproximadamente 10^9 por dosis TCID₅₀ (dosis infecciosa en cultivo tisular a la que se produce el 50 % del efecto citopático) por dosis y, preferentemente, en el intervalo de aproximadamente 10^4 a aproximadamente 10^6 TCID₅₀ por dosis. El virus de CAV-2 atenuado deberá estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 TCID₅₀ a aproximadamente 10^9 TCID₅₀ por dosis, preferentemente, en el intervalo de aproximadamente $10^{4,0}$ a aproximadamente $10^{6,0}$ TCID₅₀ por dosis. El virus de CPI atenuado deberá estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 TCID₅₀ a aproximadamente 10^9 TCID₅₀ por dosis y preferentemente, en el intervalo de 10^6 a aproximadamente 10^8 TCID₅₀ por dosis. El virus de CPV atenuado deberá estar en una cantidad de al menos aproximadamente 10^2 TCID₅₀ a aproximadamente 10^8 TCID₅₀ por dosis, preferentemente una cantidad en el intervalo de 10^7 a aproximadamente 10^9 TCID₅₀ por dosis. La cantidad de CCV en una preparación viral inactivada deberá ser de al menos aproximadamente 100 unidades relativas por dosis y, preferentemente, en el intervalo de 1000-4500 unidades relativas por dosis. Cada especie de *Leptospira* en la vacuna deberá estar en el intervalo de aproximadamente 100-3500 UN (unidades nefelométricas) por dosis de vacuna y, preferentemente, en el intervalo de 200-2000 UN por dosis.

Las vacunas de combinación se formulan de tal modo que las vacunas se pueden administrar a los perros en una dosis de 0,1 a 5 ml, o, preferentemente de 0,5 a 2,5 ml, y, más preferentemente, de aproximadamente 1 ml.

La presente invención se ilustra de forma adicional mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

ESTUDIO DE TITULACIÓN DE DOSIS DEL ANTÍGENO p68 RECOMBINANTE DE BORDETELLA CANINA

VACUNA:

El antígeno de la vacuna experimental era una proteína de membrana externa p68 recombinante (SEC ID N° 1) de *B. bronchiseptica* producida por la cepa de *E. coli* LW68. La vacuna contenía niveles variables de p68 solubilizado en SDS (dodecilsulfato sódico) adyuvado con 50 µg de QAC (Quil A/50 µg de colesterol) en una dosis de 1 ml.

MATERIAL DE EXPOSICIÓN:

Como material de exposición se usó un aerosol de *Bordetella bronchiseptica*, aislado de perro n° 85B, pase n° 3, lote n° 051597. El recuento medio por placa fue de $1,59 \times 10^8$ UFC/ml.

ANIMALES:

Sesenta cachorros de perro de ambos sexos fueron asignados aleatoriamente a uno de seis grupos de tratamiento (10 cachorros por grupo). Se extrajo sangre de los cachorros y se tomaron exudados traqueales 41 días antes de la primera vacunación y, de nuevo, 28 días antes de la primera vacunación, se retiraron del estudio todos los animales seropositivos o con cultivos positivos-

Los animales fueron asignados aleatoriamente a tratamientos y cuartos de acuerdo con un diseño de bloque completo aleatorizado. Las observaciones posvacunación se realizaron sin conocer los grupos de asignación de la vacuna.

DISEÑO:

Grupo	Nivel de dosis	Vía ¹	Número de animales
T01	Control salino (0,9 % solución salina como una dosis de 1 ml)	SC	9
T02	1 µg de p68	SC	8
T03	4 µg de p68	SC	8
T04	16 µg de p68	SC	9
T05	64 µg de p68	SC	9
T06	256 µg de p68	SC	9
SC= subcutánea			

PROCEDIMIENTO:

Administración IVP

Se vacunó a los animales el día 0 con placebo o con la vacuna experimental. El día 21 se realizó una segunda

vacunación. La primera vacunación se administró por vía subcutánea en la parte derecha del cuello y la segunda vacunación se administró por vía subcutánea en la parte izquierda del cuello.

Administración por exposición:

- 5 Todos los animales fueron expuestos a los 28 días de la segunda vacunación a un aerosol de *Bordetella bronchiseptica*. Se vigiló en los animales la aparición de tos durante un periodo de 30 minutos, dos veces al día (una vez por la mañana y una vez por la tarde) los días dos a catorce tras la exposición (del día 51 al 63)

Observaciones y obtención de muestras:

Durante siete días después de la vacunación (del día 0 al 7 y del 21 al 28) y a los 14 días de cada vacunación (días 14 y 35) se palpó todos los puntos en los que se realizó la inyección y se midieron en tres dimensiones.

- 10 Las temperaturas rectales se registraron el día de la vacunación y durante tres días tras cada vacunación (días 0 a 3 y 21 a 24).

Se extrajo sangre los días de la vacunación (días 0 y 21) y los días 42, 50 y 63, y se analizó mediante ELISA para determinar los anticuerpos específicos contra la proteína p68 purificada de *B. bronchiseptica*. También se extrajo sangre los días 42, 49, 50, 52, 54, 56 y 58 y se analizó para determinar los niveles de amiloide A sérico (SAA).

- 15 En todos los animales se realizó un exudado traqueal para aislar *B. bronchiseptica* y se extrajo sangre para determinar los títulos de aglutinación de *B. bronchiseptica* antes de la vacunación (en el proveedor, el día -41 y el día -28). Y en el día 49.

ELISA DAB de titulación de anticuerpos frente a p68 de Bordetella en perro y ratón

- 20 El p68 nativo purificado se diluyó hasta 600 ng/ml en tampón borato 0,01M y se añadió a cada pocillo a 100 µl/pocillo. Las placas se incubaron durante la noche a 4 °C. Después, las placas se lavaron una vez con PBS-Tween 20 en exceso. Se añadió a las placas 1% de leche desecada desnatada en PBS a 200 µl/pocillo. Después, las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. A continuación, las placas se lavaron una vez con PBS-Tween 20 en exceso.

- 25 En la hilera superior de las placas de ELISA se añadió suero de perro o ratón a una dilución de 1:50 y en el resto de la placa se añadió suero a una dilución en serie por dos. Las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente, las placas se lavaron 3 veces con PBS-Tween 20 en exceso.

- 30 A las anteriores placas incubadas con suero de perro se añadió IgG (H + L) de cabra anti-perro marcada con peroxidasa diluida a una dilución de 1:2000, a 100 µl/pocillo. Después, las placas se incubaron durante 1 hora a 37°C. A las placas incubadas con el suero de ratón anterior añadió IgG (H + L) de cabra anti-ratón marcada con peroxidasa diluida a una dilución de 1:4000, a 100 µl/pocillo. Después, las placas se incubaron durante 1 hora a 37 °C. A continuación, las placas se lavaron tres veces con PBS-Tween 20 en exceso.

Se añadió sustrato ABTS a 100 µl/pocillo. Aproximadamente 20 minutos después, las placas se leyeron con un lector de placas de Molecular Devices o equivalente a 405-490 nm.

ANÁLISIS DE DATOS:

- 35 Las diferencias de tratamiento en el número de perros que tosían se analizaron usando la prueba exacta de Fisher. Se usó un nivel de significación del 5 %.

Los títulos de ELISA se transformaron logarítmicamente antes del análisis usando un modelo mixto lineal general. Se usó un nivel de confianza del 95 % para evaluar las diferencias de tratamiento. Las observaciones de la exposición se controlaron dos veces al día durante 30 minutos cada vez.

40 RESULTADOS:

Cultivo del exudado traqueal y títulos de aglutinación

Se evaluaron los cultivos de los exudados traqueales y los títulos de aglutinación para controlar el estado de *B. bronchiseptica* de los animales reclutados en el estudio. Una serie de perros mostraron títulos mayores a varios puntos de tiempo, pero ningún título aumentó por encima de 128 antes de la exposición.

45 Observaciones en el lugar de la inyección

Las reacciones en el lugar de la inyección tras la primera vacunación se presentan en la Tabla 1. Las mayores reacciones en el lugar de la inyección se observaron en los animales vacunados de T05 (64 µg), de las que la mayor reacción media en el lugar de la inyección midió sólo 14,69 cm³ (dos días después de la vacunación). Los animales vacunados de T03 (4 µg), T04 (16 µg) y T06 (256 µg) mostraron reacciones variables en el lugar de la inyección

hasta 7 días después de la vacunación. Los animales vacunados de T02 (1 µg) sólo mostraron reacciones el día 1 tras la vacunación. Al séptimo día tras la vacunación no había diferencias estadísticamente significativas en las reacciones del lugar de la inyección entre los grupos de tratamiento. Para el día 14, todas las reacciones en el lugar de la inyección se habían disipado.

Las reacciones en el lugar de la inyección tras la segunda vacunación se presentan en la Tabla 2. Tras la segunda vacunación, las mayores reacciones medias en el lugar de la inyección se observaron en T06 (256 µg), de las que la mayor reacción media en el lugar de la inyección midió 50,03 cm³ (un día después de la vacunación). Las reacciones en el lugar de la inyección se demostraron en los animales de T05 (64 µg) y T04 (16 µg) hasta 7 días después de la segunda vacunación. Se demostraron reacciones en el lugar de la inyección mínimas en los animales de T03 (4 µg) y T02 (1 µg) hasta 7 días después de la vacunación. Se demostraron reacciones en el lugar de la inyección no estadísticamente diferentes de las del grupo de placebo en T02 (1 µg) y T03 (4 µg) después de la vacunación. Catorce días después de la segunda vacunación no se observaron reacciones en el lugar de la inyección.

La frecuencia de las reacciones en el lugar de la inyección tras la primera vacunación se presenta en la Tabla 3. La LSM de la frecuencia global mayor, 76 %, de los lugares de la inyección que exhibían una reacción en cualquier momento después de la primera vacunación se observó tras la vacunación con T06 (256 µg). La siguiente más frecuente fue 72 % de los lugares de la inyección que mostraban una reacción tras la primera vacunación con T05 (64 µg), 69 % tras la primera vacunación con T04 (16 µg) y 63 % tras la primera vacunación con T03 (4 µg). La frecuencia menor, 38 %, siguió a la primera vacunación de T02 (1 µg).

La frecuencia de las reacciones en el lugar de la inyección tras la segunda vacunación se presenta en la Tabla 4. La LSM de la frecuencia global para cada vacuna fue consistente con la observada tras la primera vacunación.

La incidencia y la duración de las reacciones en el lugar de la inyección tras la vacunación se resumen en la Tabla 5. La incidencia (o el número de perros que muestran una reacción en algún momento) de una reacción medible en el lugar de la inyección fue del 100 % para T03, T04, T05 y T06 (4 µg, 16 µg, 64 µg y 256 µg, respectivamente) tras la primera y la segunda vacunación. Los animales que recibieron T02 (1 µg) mostraron la menor incidencia de reacciones en el lugar de la inyección tras la vacunación (57,1 %).

La duración de la reacción (expresada como la media de mínimos cuadrados de los días con una reacción mostrada en la Tabla 5) fue mayor para los animales vacunados con T04, T05 y T06 (16 µg, 64 µg y 256 µg, respectivamente) tras la primera y la segunda vacunación (de 2,7 a 5,1 días tras la primera vacunación y de 6,0 a 6,7 días tras la segunda vacunación). Los animales vacunados con T02 y T03 (1 µg y 4 µg, respectivamente) mostraron el menor número de días con una reacción en el lugar de la inyección tras la primera y la segunda vacunación (0,3 y 1,3 días tras la primera vacunación y 1,9 y 4,5 días tras la segunda vacunación).

Temperaturas rectales

Las mediciones de la temperatura rectal media se resumen en la Tabla 6. La LSM de la temperatura rectal para T02 (1 µg) los días 1 y 24, para T03 (4 µg) los días 1, 21 y 24, para T04 (16 µg) los días 2 y 24, para T05 (64 µg) el día 23 y para T06 (256 µg) los días 0, 1 y 24 fueron significativamente diferentes de las del grupo de placebo. El día 23, ninguna comparación era estadísticamente significativa ($P > 0,05$) con respecto al placebo.

Serología de p68 mediante ELISA

En la Tabla 7 se presenta un resumen de los datos del ELISA para p68. La media geométrica de los títulos de virus antes de la vacunación de los anticuerpos específicos de p68 en el ELISA en todos los grupos fue baja (intervalo de 24,9 a 28,9) y los títulos para el placebo permanecieron bajos a lo largo de todo el estudio. Veintiún días después de la primera vacunación, la media geométrica de los títulos de p68 en el ELISA había aumentado en el tratamiento de vacunación (intervalo 55,2 a 4.411,7), no obstante el título con T02 (1 µg) no fue estadísticamente diferente del placebo (T01). Cuarenta y dos días después de la segunda vacunación, la media geométrica de los títulos aumentó más en todos los grupos vacunados (intervalo 674,6 a 48.382,0), lo que demostró una buena respuesta serológica a la vacunación.

Serología del amiloide sérico A (SAA)

Los títulos de SAA se resumen en la Tabla 8. antes de la exposición, la media geométrica de los títulos de SAA eran bajos en todos los grupos de tratamiento (intervalo de 0,1 a 0,5). Tras la exposición, los títulos de GMT con T01 variaron de 1,5 a 146,0, y en los grupos de tratamiento con p68 variaron de 0,3 a 23,1. Todos los grupos de tratamiento eran estadísticamente diferentes al placebo los días 50, 52, 54 y 56. No se demostraron diferencias estadísticas entre las vacunas con p68 con la excepción de T02 (1 µg) el día 52, momento en que se demostró una media geométrica estadísticamente diferente de todos los demás grupos de tratamiento con p68.

Respuesta a la exposición

Los datos de la respuesta a la exposición se presentan en la Tabla 9. La respuesta se determinó vigilando la tos tras

la exposición y las observaciones se analizaron usando dos procedimientos: media de mínimos cuadrados del número de días con tos y dos días consecutivos con tos (incidencia de la enfermedad).

El análisis del número medio de días con tos no mostró una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de tratamiento con p68; pero, los perros vacunados con placebo tosieron una media de 8,6 días, mientras que los perros a los que se administró las vacunas con p68 tosieron significativamente menos, variando las medias entre 2,2 y 4,7 días.

Quando se evaluó a los perros usando la Incidencia de la Enfermedad, se observó que todos los perros con T01 (placebo) tosían durante dos días consecutivos (100 % de Incidencia de la Enfermedad). Los perros vacunados con T04 (16 µg) and T05 (64 µg) presentaron una Incidencia de la Enfermedad del 55,6 % y 66,7 %, respectivamente. Se observó que sólo el 28,6 % de los perros vacunados con T02 (1 µg), el 50 % con T03 (4 µg) y el 33,3 % con T06 (256 µg) tosían durante dos días consecutivos.

DISCUSIÓN:

En este estudio, el objetivo era establecer una relación entre la dosis del antígeno, la respuesta inmunitaria y la protección en perros. Las dosis del antígeno p68 analizadas fueron 1 µg, 4 µg, 16 µg, 64 µg y 256 µg.

El análisis de las mediciones de las reacciones en el lugar de la inyección demostró una reacción insignificante en los grupos de tratamiento con p68, con la excepción de T06 (256 µg) el primer día tras la segunda vacunación. Las reacciones que se observaron tendían a ser pequeñas, en general de tamaño decreciente durante los periodos de observación. El tamaño de estas reacciones fue clínicamente insignificante y muy probablemente pasaría inadvertido en perros sin afeitar.

Las temperaturas rectales tras la vacunación fueron poco importantes y estaban dentro de los límites normales para todos los perros en todos los grupos.

La respuesta serológica a la vacunación fue excelente en los grupos T03 a T06. En estos grupos de tratamiento, todos mostraron títulos de p68 en el ELISA significativamente mayores en comparación con el placebo, desde el día 21 al día 63. Se demostró que T02 (1 µg) presentaba títulos de p68 en el ELISA significativos en comparación con T01 (placebo) desde el día 42 al día 63. Los títulos más altos se observaron en T05 (64 µg) y T06 (256 µg).

El análisis de la respuesta de SAA en todos los perros vacunados con p68 tras la exposición indicó una elevación mucho menor en el SAA tras la exposición en comparación con los perros control. No se demostraron diferencias entre los niveles de dosis de la vacuna con p68 tras la exposición, con la excepción de T02 (1 µg) el día 52, que mostró una media geométrica estadísticamente diferente de todos los demás grupos de tratamiento con p68.

Las observaciones de la tos tras la exposición se analizaron usando la media de mínimos cuadrados (LSM) del número de días con tos o dos días consecutivos con tos (incidencia de la enfermedad). Usando la LSM de los días con tos se demostró una diferencia significativa entre el placebo y todos los grupos vacunados con p68, aunque no se demostró diferencia alguna entre los diferentes niveles de dosis de la vacuna con p68. Usando la Incidencia de la Enfermedad, los perros vacunados con T02 (1 µg), T03 (4 µg) y T06 (256 µg) tosían significativamente menos que los que recibieron placebo.

CONCLUSIONES:

El estudio se realizó para establecer una relación entre la dosis del antígeno, la respuesta inmunitaria y la protección en perros. Las dosis del antígeno p68 analizadas fueron 1 µg, 4 µg, 16 µg, 64 µg y 256 µg.

Todas las vacunas eran seguras, lo que se demostró por la aparición de reacciones mínimas en el lugar de la inyección, temperaturas rectales normales y ausencia de respuesta adversa a la vacunación. El tamaño de las reacciones en el lugar de la inyección y la duración de estas reacciones fueron menores en los grupos de tratamiento antigénico menor. La respuesta serológica a la vacunación medida mediante los títulos de ELISA fue excelente con los grupos de dosis antigénicas mayores, lo que demuestra respuestas serológicas mayores. Al usar la LSM de los días con tos como procedimiento de comparación, todos los grupos de tratamiento mostraron una reducción significativa de la tos en comparación con el placebo. No se observaron diferencias entre los grupos de tratamiento. Cuando se usó la tos durante dos días consecutivos (o la Incidencia de la Enfermedad) para comparar, los perros vacunados con T02 (1 µg), T03 (4 µg) y T06 (256 µg) tosían significativamente menos que los que recibieron placebo.

Tabla 1. Volumen de la reacción en el lugar de la inyección en perros tras la primera vacunación con antígeno p68 o placebo

	Tratamiento (N)	Media LS del tamaño (cm ³) de las reacciones en el lugar de la inyección tras la primera vacunación por día del estudio ¹ :								
		0	1	2	3	4	5	6	7	14
T01	Placebo (9)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	0,00 ^a	4,00 ^b	0,00 ^{a,b}	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^{e,b}	0,00 ^a	0,00 ^a
T03	p68, 4 µg (8)	0,00 ^a	0,00 ^{ac}	0,64 ^{a,b}	4,56 ^b	1,14 ^{a,b}	0,39 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
T04	p68, 16 µg (9)	0,00 ^a	0,00 ^a	3,56 ^b	4,28 ^b	1,32 ^{a,b}	1,79 ^{a,b}	2,36 ^{a,b}	0,38 ^a	0,00 ^a
T05	p68, 64 µg (9)	0,00 ^a	10,44 ^b	14,69 ^c	10,56 ^c	4,01 ^{b,c}	4,40 ^b	2,82 ^{a,b}	1,15 ^a	0,00 ^a
T06	p68, 256 µg (9)	0,00 ^a	7,00 ^e	8,53 ^d	7,50 ^{b,c}	5,62 ^c	4,36 ^b	3,56 ^b	1,24 ^a	0,00 ^a

Tabla 2. Volumen de la reacción en el lugar de la inyección en perros tras la segunda vacunación con antígeno p68 o placebo

	Tratamiento (N)	Media LS del tamaño (cm ³) de las reacciones en el lugar de la inyección tras la segunda vacunación por día del estudio ¹ :								
		0 (21)	1 (22)	2 (23)	3 (24)	4 (25)	5 (26)	6 (27)	7 (28)	14 (35)
T01	Placebo (9)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	0,00 ^a	0,54 ^a	2,36 ^{a,b}	1,14 ^a	0,45 ^a	0,61 ^a	0,50 ^a	0,16 ^a	0,00 ^a
T03	p68, 4 µg (8)	0,00 ^a	0,00 ^a	5,33 ^{a,b,c}	4,20 ^a	2,59 ^{a,b}	2,89 ^{a,b}	1,53 ^a	1,23 ^{a,b}	0,00 ^a
T04	p68, 16 µg (9)	0,00 ^a	0,00 ^a	7,58 ^{b,c}	10,67 ^b	7,25 ^{b,c}	7,28 ^c	7,97 ^b	5,14 ^{a,b}	0,00 ^a
T05	p68, 64 µg (9)	0,00 ^a	2,89 ^a	10,99 ^c	14,28 ^b	9,79 ^c	9,75 ^c	11,14 ^b	6,50 ^b	0,00 ^a
T06	p68, 256 µg (9)	0,00 ^a	50,03 ^b	8,58 ^{b,c}	13,44 ^b	11,32 ^c	7,42 ^{b,c}	9,51 ^b	2,69 ^{a,b}	0,00 ^a

¹Los valores con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Tabla 3. Frecuencia de la reacción en el lugar de la inyección tras la primera vacunación con antígeno p68 o placebo

Tratamiento (N)		Porcentaje medio LS de perros por Pen ² con reacción tras la primera vacunación por día del estudio ³ :											
		0	1	2	3	4	5	6	7	14			
T01	Placebo (9)	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a			
T02	p68, 1 µg (7)	0,00 ^a	100,00 ^b	83,33 ^b	50,00 ^b	25,00 ^a	12,50 ^a	37,50 ^b	37,50 ^b	0,00 ^a			
T03	p68, 4 µg (8)	0,00 ^a	90,00 ^{b,c}	80,00 ^b	90,00 ^c	80,00 ^b	63,33 ^b	80,00 ^c	80,00 ^c	0,00 ^a			
T04	p68, 16 µg (9)	0,00 ^a	62,50 ^c	87,50 ^b	100,00 ^c	100,00 ^b	77,50 ^{b,c}	87,50 ^c	100,00 ^c	10,00 ^a			
T05	p68, 64 µg (9)	0,00 ^a	90,00 ^{b,c}	100,00 ^b	100,00 ^c	90,00 ^b	90,00 ^{b,c}	90,00 ^c	90,00 ^c	0,00 ^a			
T06	p68, 256 µg (9)	0,00 ^a	100,00 ^{b,d}	100,00 ^b	100,00 ^c	100,00 ^b	100,00 ^c	87,50 ^c	100,00 ^c	0,00 ^a			

Tabla 4. Frecuencia de la reacción en el lugar de la inyección tras la segunda vacunación con antígeno p68 o placebo

Porcentaje medio LS de perros por Lápi ^z con reacción tras la segunda vacunación por día del estudio ² :											
Tratamiento (N)		0 (21)	1 (22)	2 (23)	3 (24)	4 (25)	5 (26)	6 (27)	7 (28)	14 (35)	
T01	Placebo (9)	0,00 ^a	0,00 ^a	20,00 ^a	10,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	0,00 ^a	
T02	p68, 1 µg (7)	0,00 ^a	58,33 ^b	58,33 ^b	58,33 ^b	45,83 ^b	41,67 ^b	41,67 ^b	29,17 ^b	0,00 ^b	
T03	p68, 4 µg (8)	0,00 ^a	83,33 ^b	100,00 ^d	100,00 ^c	90,00 ^c	73,33 ^c	73,33 ^c	73,33 ^c	0,00 ^a	
T04	p68, 16 µg (9)	0,00 ^a	90,00 ^{c,d}	100,00 ^d	100,00 ^c	100,00 ^c	100,00 ^d	100,00 ^d	100,00 ^d	0,00 ^a	
T05	p68, 64 µg (9)	0,00 ^a	100,00 ^d	100,00 ^d	100,00 ^c	100,00 ^c	100,00 ^d	100,00 ^d	100,00 ^d	0,00 ^a	
T06	p68, 256 µg (9)	0,00 ^a	100,00 ^d	100,00 ^d	100,00 ^c	100,00 ^c	100,00 ^d	100,00 ^d	87,50 ^{c,d}	0,00 ^a	

²Dos lápi^z por tratamiento

³Los valores con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$)

²Dos lápices por tratamiento

³Los valores con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Tabla 5: Duración de las reacciones en el lugar de la inyección tras la vacunación con antígeno p68 o placebo

	Tratamiento (N)	Reacción medible (en cualquier momento)	Media LS de días con reacción ⁴ (tras la primera vacunación)	Media LS de días con reacción ¹ (tras la segunda vacunación)
T01	Placebo (9)	0/9 (0 %)	0,0 ^a	-0,0 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	4/7 (57,1 %)	0,3 ^a	1,9 ^b
T03	p68, 4 µg (8)	8/8 (100 %)	1,3 ^{a,b}	4,5 ^c
T04	p68, 16 µg (9)	9/9 (100 %)	2,7 ^b	6,0 ^d
T05	p68, 64 µg (9)	9/9 (100 %)	4,9 ^c	6,3 ^d
T06	p68, 256 µg (9)	9/9 (100 %)	5,1 ^c	6,7 ^d

⁴Los valores con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Tabla 6. Temperaturas rectales medias para perros tras la vacunación con antígeno p68 o placebo

Tratamiento (N)		Media LS de la temperatura rectal por día de estudio ^b						
		0	1	2	3	21	22	23
T01	Placebo (9)	38,9 ^{a,b}	38,9 ^a	38,9 ^{a,b}	39,0 ^a	39,0 ^a	38,8 ^a	38,9 ^{a,b}
T02	p68, 1 µg (7)	39,0 ^{a,b}	38,5 ^b	38,8 ^a	38,4 ^b	38,7 ^a	38,6 ^a	38,7 ^{a,b}
T03	p68, 4 µg (8)	39,0 ^a	38,7 ^{a,b}	38,6 ^a	39,0 ^a	38,6 ^b	38,6 ^a	38,6 ^a
T04	p68, 16 µg (9)	39,0 ^a	39,0 ^a	38,9 ^b	38,7 ^{a,b}	38,7 ^a	38,8 ^a	38,7 ^{a,b}
T05	p68, 64 µg (9)	38,9 ^{a,b}	38,9 ^a	38,9 ^{a,b}	38,8 ^a	38,7 ^a	38,7 ^a	39,0 ^b
T06	p68, 256 µg (9)	38,7 ^b	39,3 ^c	38,8 ^{a,b}	39,0 ^a	38,8 ^a	38,8 ^a	38,9 ^{a,b}

5

Tabla 7. Títulos de p68 en la serología con ELISA DAB en perros tras la vacunación con antígeno p68 o placebo⁶

Tratamiento (N)		Media geométrica de los títulos del virus para ELISA de p68 por día de estudio ² :				
		0	21	42	49	63
T01	Placebo (9)	25,2 ^a	48,3 ^a	30,0 ^a	28,2 ^a	230,4 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	25,5 ^a	55,2 ^a	674,6 ^b	294,4 ^b	1301,7 ^b
T03	p68, 4 µg (8)	25,3 ^a	310,9 ^b	7865,0 ^c	4414,8 ^c	10580,1 ^c
T04	p68, 16 µg (9)	28,9 ^a	515,4 ^b	12180,4 ^c	5824,4 ^c	11429,3 ^c
T05	p68, 64 µg (9)	25,3 ^a	1699,5 ^c	36460,6 ^d	17593,9 ^d	22689,3 ^{c,d}
T06	p68, 256 µg (9)	24,9 ^a	4411,7 ^d	48382,0 ^d	25980,9 ^d	30594,3 ^d

¹ Las vacunaciones se administraron los días del estudio 0 y 21. Los valores con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$)

⁶ Las vacunaciones se administraron los días del estudio 0 y 21 y la exposición se realizó el día 49 del estudio.

² Los valores con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$)

Tabla 8. Títulos de amiloide sérico A (SAA) en perros tras la exposición de los perros vacunados a antígeno p68 o placebo

Tratamiento (N)		Media geométrica de los títulos de amiloide sérico a por día de estudio tras la exposición ⁷ :					
		49	50	52	54	56	58
T01	Placebo (9)	0,2 ^a	146,0 ^a	87,2 ^a	153,6 ^a	14,7 ^a	1,5 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	0,2 ^a	8,3 ^b	1,2 ^b	0,7 ^b	0,6 ^b	0,3 ^a
T03	p68, 4 µg (8)	0,2 ^a	9,9 ^b	6,4 ^c	2,3 ^b	1,2 ^b	1,8 ^a
T04	p68, 16 µg (9)	0,1 ^a	163 ^b	11,6 ^c	3,0 ^b	1,6 ^b	1,4 ^a
T05	p68, 64 µg (9)	0,5 ^a	11,4 ^b	8,0 ^c	3,4 ^b	1,3 ^b	1,2 ^a
T06	p68, 256 µg (9)	0,5 ^a	23,1 ^b	16,4 ^c	3,8 ^b	1,1 ^b	0,4 ^a

¹ Los valores con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$)

10

Tabla 9. Índice y duración de la tos en perros tras la exposición de los perros vacunados a antígeno p68 o placebo

	Tratamiento (N)	Incidencia de la enfermedad ^{8,2}	Media LS de días con tos ²
T01	Placebo (9)	9/9 ^a (100 %)	8,6 ^a
T02	p68, 1 µg (7)	2/7 ^b (28,6 %)	2,2 ^b
T03	p68, 4 µg (8)	4/8 ^b (50 %)	3,8 ^b
T04	p68, 16 µg (9)	5/9 ^{a,b} (55,6 %)	3,7 ^b
T05	p68, 64 µg (9)	6/9 ^{a,b} (66,7 %)	4,7 ^b
T06	p68, 256 µg (9)	3/9 ^b (33,3 %)	3,0 ^b

⁸ Basado en tos dos días consecutivos.² Los valores con superíndices diferentes son estadísticamente diferentes ($P \leq 0,05$)**EJEMPLO 2****5 ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD CON P68 DE BORDETELLA CANINA****Animales**

Se adquirieron cuarenta y cinco perros machos y hembras de raza mixta. Se administró una vacuna contra el parvovirus MLV a todos los cachorros el día en que los cachorros llegaron al centro del estudio. No se administró a los cachorros ninguna otra vacuna, aparte de los productos experimentales, durante el estudio. Los perros tenían aproximadamente 9 semanas de edad (± 1 semana) el día 0 (día de la primera vacunación).

Se mantuvo a los perros en una instalación de aislamiento, necesario para prevenir la exposición a *Bordetella* y a otros patógenos caninos antes de la exposición. Después de la exposición mediante aerosol *Bordetella* se continuaron los procedimientos de aislamiento para prevenir la exposición a otros patógenos caninos.

Vacunas

En los grupos de tratamiento T01 y T02 se usó solución salina estéril como vacuna placebo. La vacuna de p68 recombinante canina de *Bordetella Bronchiseptica* se usó en los grupos de tratamiento T03 y T04. El gen estructural del antígeno p68 se clonó en *Escherichia coli* y la expresión del gen se reguló mediante un promotor sensible a la temperatura. Las células se lisaron y los cuerpos de inclusión se separaron mediante centrifugación. El p68 recombinante en los cuerpos de inclusión se solubilizó mediante tratamiento con SDS. El p68 recombinante (15 µg por ml) se combinó con 50 µg de Quil A y 50 µg de colesterol por ml en solución salina estéril como diluyente. Cada dosis de un ml contenía 0,28 % de etanol y 0,01 % de timerosal.

Inóculo de exposición

La cepa Bihl Cat de *Bordetella bronchiseptica* se preparó como inóculo de exposición usando el procedimiento actualmente empleado por Biologics Control Laboratories-Microbiology. Placas de agar Bordet-Genou se sembraron con un crecimiento confluyente de *Bordetella bronchiseptica*, cepa Bihl Cat, y se incubaron durante 48 horas a $37,5 \pm 2,5$ °C. Las colonias virulentas de la fase I se seleccionaron y se sembraron mediante raspado en agar Bordet-Genou y se incubaron durante 24 horas a $37,5 \pm 2,5$ °C. Tras la incubación se usó solución salina de Bordetella para lavar las colonias del agar y el antígeno se diluyó hasta una densidad óptica de 0,80 a 600 nm. Se realizó un recuento de células antes y después de la exposición para confirmar la lectura del nefelómetro. La concentración diana para exposición fue de aproximadamente 1×10^9 UFC. La concentración pre-exposición fue de $2,37 \times 10^8$ UFC (100 % fase I) y el recuento de la concentración postexposición fue de $1,35 \times 10^9$ UFC (100 % fase I).⁸ UFC

Diseño del estudioTabla resumen

Grupo de tratamiento	Tratamiento	Vía	Número de animales
T01	Control salino	Intramuscular	8
T02	Control salino	Subcutánea	7
T03	p68 15 µg/dosis	Subcutánea	15
T04	p68 15 µg/dosis	Intramuscular	15

Aleatorización/Enmascaramiento

Durante el periodo de tiempo desde la vacunación hasta el día de la exposición, los animales fueron asignados a tratamientos de acuerdo con un diseño de bloque generalizado. Los tratamientos fueron asignados al azar a los cuartos. El día de la exposición, se asignó aleatoriamente a los animales a los cuartos de exposición por bloque.

- 5 Individuos cualificados, que no conocían los grupos de tratamiento asignados, realizaron ensayos microbiológicos y serológicos, y evaluaciones de los lugares de la inyección, mediciones de las temperaturas rectales y observaciones de la tos.

Análisis de Datos

- 10 Las variables de la respuesta a la vacunación consistían en los datos del lugar de la inyección, las temperaturas rectales y los títulos en el ELISA de p68. Los datos del lugar de la inyección se resumieron de los siguientes modos: 1) número de animales que tienen una reacción medible por tratamiento y día de estudio, 2) número de puntos de tiempo del animal que tiene una reacción medible por tratamiento, 3) número de animales que tiene una reacción medible por tratamiento en cualquier punto de tiempo por tratamiento.

- 15 Por separado de la primera y la segunda vacunación, los datos del volumen del lugar de la inyección (cm cúbicos), las temperaturas rectales y del log natural transformada del título de ELISA p68 se analizaron usando un modelo mixto lineal general.

- 20 Se construyeron contrastes lineales a priori del tratamiento por media de mínimos cuadrados del punto de tiempo de observación para analizar las diferencias del grupo de tratamiento en cada punto de tiempo de observación y comparar los puntos de tiempo dentro de cada tratamiento. Para todas las comparaciones se usó un nivel de significación del 5 %.

Las variables de la respuesta postexposición consistían en observaciones diarias de la tos, los títulos de ELISA p68 y los títulos de amiloide sérico A. El número de días de tos durante el periodo de postexposición se analizó usando un modelo mixto lineal general.

- 25 Se construyeron contrastes *a priori* de la media de mínimos cuadrados del tratamiento para analizar las diferencias por grupo de tratamiento. Para todas las comparaciones se usó un nivel de significación del 5 %.

Por separado de la primera y la segunda vacunación, la prueba exacta de Fisher se usó para comparar los grupos de tratamientos para la incidencia de dos días consecutivos de tos. Para todas las comparaciones se usó un nivel de significación del 5 %.

- 30 Para los datos de los títulos de amiloide sérico A (SAA) tras la exposición se aplicó la transformación log natural a los valores del título antes del análisis usando un modelo mixto lineal general.

Se construyeron contrastes lineales a priori del tratamiento por media de mínimos cuadrados del punto de tiempo de observación para analizar las diferencias del grupo de tratamiento en cada punto de tiempo de observación y comparar los puntos de tiempo dentro de cada tratamiento. Para todas las comparaciones se usó un nivel de significación del 5 %.

Procedimiento del estudio

Procedimientos detallados del animal

- 40 Cuarenta y cinco (45) cachorros seronegativos y con cultivos negativos fueron asignados aleatoriamente a uno de 4 grupos de tratamiento. Ocho y siete perros se asignaron a los grupos control intramuscular (IM) o subcutáneo (SC) respectivamente, para un total de 15 perros control. Quince perros se asignaron al grupo de tratamiento SC con p68 y 15 perros se asignaron al grupo de tratamiento IM con p68. Los grupos de tratamiento se detallan en la sección Diseño del estudio anterior.

- 45 El día 0 se designó como el día de la primera vacunación. Las vacunaciones se administraron el día 0 y se repitieron 21 días después. Para la primera vacunación se usó el lado derecho del cuello y para la segunda vacunación se usó el lado izquierdo del cuello. Las inyecciones intramusculares se administraron en el músculo semimembranoso derecho e izquierdo para la primera y la segunda vacunación, respectivamente. Todos los lugares de la inyección se midieron en tres dimensiones durante siete días tras cada vacunación con una medición de seguimiento realizada 14 días después de la vacunación. Las temperaturas rectales se monitorizaron el día de la vacunación (antes de la vacunación) y durante tres días tras cada vacunación.

- 50 El día 35, de todos los animales se obtuvo un exudado traqueal para cultivo de *B. bronchiseptica* y se extrajo sangre para los títulos de aglutinación. Todos los animales dieron negativo en el exudado traqueal y eran serológicamente negativos a *Bordetella*, y se estimó que eran aptos para la exposición.

El día 45, veinticuatro días después de la segunda vacunación se administró a todos los perros una exposición en

aerosol de *B. bronchiseptica*. Los perros sedados fueron expuestos usando un cono nasal desechable, que se ajustó bien sobre el hocico del perro sedado. El cono nasal se fijó a un nebulizador que estaba fijado a una bomba de presión de vacío fijada a 0,04 a 0,041 MPa. Un ml del material de exposición se introdujo en el nebulizador y el material de exposición aerosolizado se administró a cada perro durante 4 minutos. El personal que realizaba las observaciones desconocía las asignaciones del grupo de tratamiento.

Se monitorizó la tos de los animales durante 14 días después de la exposición (días 46-59). Las observaciones se realizaron en 2 (dos) periodos de aproximadamente 30 minutos aproximadamente a la misma hora del día, una por la mañana y otra por la noche, y se registraron los resultados.

Obtención de sangre

La sangre para los títulos de aglutinación se obtuvo antes de la primera vacunación y antes de la exposición. La sangre para la evaluación en ELISA de anti-p68 se obtuvo antes de la vacunación los días 0 y 21 y los días 35, 45 y 59. La sangre para el ensayo para el amiloide sérico A (SAA) se obtuvo el día de la exposición (día 45) y los días 46, 48, 50, 52 y 54.

Pruebas realizadas con las muestras

Se evaluaron los exudados traqueales para detectar la presencia de *B. bronchiseptica* mediante cultivo. Cada exudado traqueal se sembró sobre una placa de agar selectivo para *Bordetella*. Se incluyeron controles positivos y negativos. Las placas se incubaron a $37,5 \pm 2,5$ °C durante 48 ± 4 horas. Las colonias resultantes en cada placa se compararon con el control positivo y cualquier colonia que pareciera idéntica al control positivo se analizó después para confirmar la presencia de *B. bronchiseptica*. Las pruebas conformacionales incluyeron el uso de TSI, citrato y agar urea y medio con rojo nitrato.

Los sueros se evaluaron para detectar los títulos de aglutinación, análisis de ELISA p68 o análisis de SAA usando los procedimientos siguientes.

Títulos de aglutinación- Los sueros se diluyeron en serie en placas de microtitulación usando solución salina de *Bordetella*. En cada placa se incluyeron controles positivos o negativos. La cepa 87 (cultivada en agar Bordet Genou, recogida, inactivada y diluida al 20 % T a 630 nm) se usó como antígeno de aglutinación y se añadió a cada pocillo. Las placas se agitaron e incubaron a 35 ± 2 °C durante 2 horas. Las placas se leyeron después de una segunda incubación a temperatura ambiente durante 22 horas. El título final se determinó usando el último pocillo para mostrar 50 % de aglutinación.

Títulos de ELISA p68 - El antígeno p68 recombinante se capturó en una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con un antisuero policlonal específico del antígeno p68 de *Bordetella*. A la placa se añadieron diluciones en serie al doble del suero canino y se incubó. En cada placa se incluyeron controles positivos y negativos a una dilución de 1:1000. Se usó un conjugado indicador de IgG anti-perro de cabra purificado por afinidad marcado con peroxidasa para detectar anticuerpos específicos para el antígeno p68. Después se añadió un sustrato A BTS cromogénico y se leyó la placa cuando los pocillos control positivo tenían una DO de $1,2 \pm 0,2$. Se calculó el título de una muestra dada como el recíproco de la última dilución con una densidad óptica superior a la media de la dilución de suero control negativo más cinco desviaciones estándar.

Títulos de SAA – Los títulos de amiloide sérico A canino se evaluaron usando un kit adquirido en Accuplex Co., University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE 68198. Brevemente, el SAA canino se capturó en una placa de microtitulación revestida con un anticuerpo monoclonal anti-SAA canino. Se añadieron a la placa muestras diluidas del suero salino, seguido de un conjugado de anticuerpo anti-canino marcado con biotina. Tras la incubación se añadió un sustrato cromogénico conjugado con estreptavidina peroxidasa. La placa se leyó tras 30 minutos.

Resultados

Temperaturas rectales

El resumen de las mediciones de la temperatura rectal se presenta en las tablas 10 y 11.

Tabla 10: Media de mínimos cuadrados de las temperaturas rectales (°C) en perros tras vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (tras la primera vacunación^a)

Tratamiento	Temperaturas rectales (°C)				Error Est.
	Día del estudio				
	0	1	2	3	
T01 salino IM	38,2	38,2	38,2	38,2	0,08
T02 salino SC	38,0	38,3	38,2	38,2	0,09
T03 p68 SC	38,1	38,3	38,1	38,0	0,06
T04 p68 IM	38,2	38,4	38,2	38,2	0,06
ª Primera vacunación administrada el día 0					

^a Primera vacunación administrada el día 0.

Tabla 11: Media de mínimos cuadrados de las temperaturas rectales (°C) en perros tras vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (tras la segunda vacunación^a)

Tratamiento	Temperaturas rectales (°C)				Error Est.
	Día del estudio				
	21	22	23	24	
T01 salino IM	38,1	38,3	38,2	38,2	0,10
T02 salino SC	38,5	38,5	38,2	38,2	0,10
T03 p68 SC	38,0	38,3	38,1	38,1	0,08
T04 p68 IM	38,1	38,4	38,4	38,4	0,08

^a Segunda vacunación administrada el día 21.

- 5 No se observaron diferencias significativas entre cualquiera de los grupos cualquier día tras la primera vacunación. Se observó una diferencia significativa entre los perros vacunados con solución salina y todos los perros vacunados con p68 ($p=0,0053$ para T01T02 v T03T04) el día 21. Se demostró una diferencia significativa ($p=0,0124$) entre los vacunados SC e IM con p68 el día 24.

Reacciones en el lugar de la inyección

- 10 Las reacciones en el lugar de la inyección se resumen en las Tablas 12 y 13. Debido a un descuido técnico no se realizaron observaciones en el lugar de la inyección en la observación a los 14 días tras la segunda vacunación (Día 35).

Se observaron reacciones medibles en el lugar de la inyección en T03 (p68 SC) y fueron de tamaño mínimo. En un perro de T04 (p68 IM) se observó una pequeña reacción en el lugar de la inyección al día 3, pero el mínimo impacto de la medición no se refleja en la media global para el grupo.

- 15 **Tabla 12: Media de mínimos cuadrados (cm cúbicos) de las reacciones en el lugar de la inyección en perros tras vacunación con solución salina o p68 (15 µg/dosis) de Bordetella (tras la primera vacunación^a)**

Tratamiento ^b	Tamaño medio (cm cúbicos) de las reacciones en el lugar de la inyección							
	Día de estudio							
	1	2	3	4	5	6	7	14
T01 salino IM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T02 salino SC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T03 p68 SC	7,4	4,3	6,8	3,4	2,5	2,6	1,9	0,1
T04 p68 IM	0,0	0,0	0,0 ^c	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

^a Primera vacunación administrada el día 0

^b Error estándar para T01= 0,80, T02=0,84, T03=0,70, y T04=0,70

^c Un perro presentó una pequeña reacción en el lugar de la inyección (0,5 cm²) pero debido al redondeado, el impacto mínimo del valor no se refleja en la media global.

Tabla 13. Media de mínimos cuadrados (cm cúbicos) de las reacciones en el lugar de la inyección en perros tras vacunación con solución salina o p68 (15 µg/dosis) de Bordetella (tras la segunda vacunación^a)

Tratamiento ^b	Tamaño medio (cm cúbicos) de las reacciones en el lugar de la inyección						
	Día del estudio						
	22	23	24	25	26	27	28
T01 salino IM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T02 salino SC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
T03 p68 SC	8,6	9,2	9,5	7,3	5,2	4,7	5,1
T04 p68 IM	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

^a Segunda vacunación administrada el día 21

^b Error estándar para T01= 1,12, T02 = 1,19, T03 = 0,92, y T06 = 0,92

- 20 En la Tabla 14 se resumen las diferencias significativas en las mediciones de los lugares de la inyección. Se observó una diferencia significativa en las mediciones de los lugares de la inyección entre T02 (salino SC) frente a T03 (p68 15 µg SC) durante siete días tras la primera vacunación. El día 7 y de nuevo el día 14 (la observación de reevaluación de dos semanas) no se observaron diferencias significativas entre ningún grupo de tratamiento.
- 25 Se observó una diferencia significativa en las mediciones de los lugares de la inyección entre T02 (salino SC) frente a T03 (p68 15 µg SC) durante siete días tras la segunda vacunación.

Tabla 14. Valores de significación para contrastes *a priori* entre la media de mínimos cuadrados de las mediciones de la reacción en el lugar de la inyección.

Día de estudio	Contrastes (tratamiento frente a tratamiento)	Valor p
1	T02 v T03	0,0001
	T03 v T04	0,0001
	T01T02 v T03T04	0,0001
2	T02 v T03	0,0007
	T03 v T04	0,0008
	T01T02 v T03T04	0,0101
3	T02 v T03	0,0001
	T03 v T04	0,0001
	T01T02 v T03T04	0,0002
4	T02 v T03	0,0044
	T03 v T04	0,0042
	T01T02 v T03T04	0,0339
5	T02 v T03	0,0313
	T03 v T04	0,0253
22	T02 v T03	0,0001
	T03 v T04	0,0001
	T01T02 v T03T04	0,0002
23	T02 v T03	0,0001
	T03 v T04	0,0001
	T01T02 v T03T04	0,0001
24	T02 v T03	0,0001
	T03 v T04	0,0001
	T01T02 v T03T04	0,0001
25	T02 v T03	0,0001
	T03 v T04	0,0001
	T01T02 v T03T04	0,0013
26	T02 v T03	0,0013
	T03 v T04	0,0007
	T01T02 v T03T04	0,0172
27	T02 v T03	0,0035
	T03 v T04	0,0019
	T01T02 v T03T04	0,0313

Sólo se presentan los contrastes significativos ($P < 0,05$).

Títulos de p68 en ELISA

- 5 Los datos de ELISA de p68 se resumen en la Tabla 15 y la Figura 1. debido a la considerable respuesta de títulos a p68 en los perros vacunados se usaron varios mínimos de titulación a diferentes puntos de tiempo en el estudio. Las titulaciones para los días 0 y 21 comenzaron a 50. Para los días 35, 45 y 59, las titulaciones comenzaron a 200. Cualquier valor indicado como "menor que" se dividió por dos antes del análisis. El aumento incremental observado en los valores de p68 ELISA para los grupos control (T01 y T02) durante el curso del estudio se debe a estos valores
- 10 mínimos de titulación. Los títulos de aglutinación permanecieron < 4 .

Todos los animales vacunados con p68 mostraron un incremento por al menos cuatro de los títulos desde el primer día de la vacunación hasta el día de la exposición (día 0 frente al día 45) cuando se comparó con los animales vacunados con placebo.

Tabla 15. Media geométrica y errores estándar de los títulos finales de ELISA de p68 (15 µg/dosis) en perros tras vacunación con solución salina o p68 (15 µg/dosis) y después de la exposición a aerosol de *B. bronchiseptica*.

Tratamiento	Día del estudio ^b									
	0	Error Est.	21	Error Est.	35	Error Est.	45	Error Est.	59	Error Est.
T01 sa lino IM	25,0	4,78	25,0	4,78	125,4	23,96	100,0	18,14	130,0	32,24
T02 sa lino SC	25,0	5,06	25,0	5,06	113,5	23,00	100,0	19,39	100,0	26,50
T03 p68 SC	25,0	3,93	189,5	29,77	10688,7	1679,20	4555,1	603,43	8796,0	1592,43
T04 p68 IM	25,0	3,93	121,4	19,08	11023,7	1731,85	4419,2	585,44	13718,1	2483,54

^aLas titulaciones para los días 0 y 21 comenzaron a 50. Las titulaciones para los días 35, 45 y 59, las titulaciones comenzaron a 200. Cualquier valor indicado como "menor que" se dividió por dos antes del análisis.

^bLa primera vacunación se produjo el día 0; la segunda vacunación se produjo el día 21 y la exposición se realizó el día 45.

- 5 Las diferencias significativas para la media de mínimos cuadrados de los títulos de ELISA posvacunación y postexposición se indican en la Tabla 16. No se observaron diferencias significativas entre los animales vacunados con p68 SC y p68 IM tras completar la vacunación.

Tabla 16: Valores de significación para los contrastes a priori entre la media de mínimos cuadrados de los títulos finales de ELISA p68 posvacunación y postexposición.

Día de estudio	Contraste	Valor p
21	T01 v T04	0,0001
	T02 v T03	0,0001
	T03 v T04	0,0491
35	T01 v T04	0,0001
	T02 v T03	0,0001
45	T01 v T04	0,0001
	T02 v T03	0,0001
59	T01 v T04	0,0001
	T02 v T03	0,0001

Sólo se presentan los contrastes significativos (P< 0,05).

10

Títulos de amiloide sérico A

Los valores de SAA se determinaron los días 0, 1, 3, 5, 7 y 9 tras la exposición. Los valores de amiloide sérico A se presentan en la Tabla 17 y se representan en la figura 2.

- 15 **Tabla 17: Media geométrica y errores estándar de los títulos de amiloide sérico A en perro vacunados con solución salina y p68 (15 µg/dosis) de *Bordetella* tras la exposición en aerosol a *Bordetella bronchiseptica***

Media geométrica y errores estándar del amiloide sérico A												
Día del estudio ^a												
	45		46		48		50		52		54	
TRT	Media	Error est.	Media	Error est.	Media	Error est.	Media	Error est.	Media	Error est.	Media	Error est.
T01	0,1	0,02	277,3	125,30	82,4	42,17	69,8	28,60	6,0	2,24	1,2	0,33
T02	0,4	0,06	384,5	185,63	128,9	70,46	215,9	94,56	28,0	11,23	3,7	1,11
T03	0,5	0,05	31,7	10,51	6,0	2,25	2,3	0,68	0,8	0,23	1,3	0,27
T04	0,3	0,04	50,0	16,58	8,6	3,22	5,0	1,50	2,4	0,65	0,7	0,14

^aExposición administrada el día 45

- 20 Las diferencias significativas en los títulos de SAA se resumen en la Tabla 18. Los controles salinos mostraron mayores títulos de SAA que los perros vacunados los días 1, 3 y 5 tras la exposición. Los controles salinos SC continuaron para demostrar títulos significativamente mayores de SAA en comparación con los perros vacunados SC los días 7 y 9 tras la exposición.

Tabla 18. Valores de significación para contrastes *a priori* entre la media de mínimos cuadrados de los títulos de amiloide sérico A postexposición.

Día de estudio	Contraste	Valor p
46	T01 v T04	0,0025
	T02 v T03	0,0001
48	T01 v T04	0,0007
	T02 v T03	0,0001
50	T01 v T04	0,0001
	T02 v T03	0,0001
52	T01 v T04	0,0093
	T02 v T03	0,0001
54	T02 v T03	0,0493

Sólo se presentan los contrastes significativos ($P < 0,05$).

Observaciones de tos

- 5 La exposición al aerosol para todos los grupos de tratamiento se produjo 24 días después de la segunda vacunación (Día 45). Las observaciones de tos se analizaron usando dos procedimientos, El estado de la enfermedad en base a dos días consecutivos de tos (presentado en la **Tabla 19**) y el porcentaje de días con tos (presentado en las **Tablas 20 y 21**). Cuando se evaluó a los perros usando los criterios de dos días consecutivos de tos, el 80 % de los perros vacunados con p68 (SC e IM) tosieron al menos dos días consecutivos, mientras que los perros vacunados con salino SC y salino IM tosió el 100 % y el 87,5 %, respectivamente. Cuando se evaluó a los perros usando el porcentaje de días en los que se observó tos, de los perros vacunados con p68 SC e IM tosió el 38,72 % y el 41,05 % de los días observados, respectivamente. De los perros vacunados con salino SC y salino IM tosió el 69,04 % y el 62,66 %, respectivamente.

- 15 **Tabla 19. Resumen del estado de la enfermedad en perros vacunados con solución salina y p68 (15 µg/dosis) de Bordetella en base a dos días consecutivos con tos tras la exposición en aerosol a *Bordetella bronchiseptica***

Número de tratamiento	Nº de perros	Porcentaje de perros con tos durante dos días consecutivos
T01 salino IM	8	87,5
T02 Salino SC	7	100,0
T03 p68 15 µg/dosis SC	15	80,0
T04 p68 15 µg/dosis IM	15	80,0

No se demostraron diferencias significativas entre los perros vacunados con solución salina y con p68 cuando el estado de la enfermedad se basaba en dos días consecutivos con tos.

- 20 **Tabla 20. Porcentaje medio de días con tos en perros vacunados con solución salina y p68 (15 µg/dosis) de Bordetella tras la exposición en aerosol a *Bordetella bronchiseptica***

	Tratamiento	Número de perros	Media	Error est.
T01	Salino IM	8	62,66 %	8,67
T02	Salino SC	7	69,04 %	8,86
T03	p68 15 µg/dosis SC	15	38,72 %	6,38
T04	p68 15 µg/dosis IM	15	41,05 %	6,44

Se demostró una diferencia significativa ($p = 0,0112$) entre T02 (salino SC) y T03 (p68 15 µg SC). No se demostraron diferencias significativas entre T01 (salino IM) y T04 (p68 15 µg IM).

- 25 **Tabla 21. Porcentaje medio de días con tos por tratamiento en perros vacunados con solución salina y p68 (15 µg/dosis) de Bordetella tras la exposición en aerosol a *Bordetella bronchiseptica***

Parámetro	Estimación	Error est.
Media de salino (T01 y T02)	65,89 %	1,10
15 µg/dosis, media (T03 y T04)	39,88 %	4,34

Se demostró una diferencia significativa ($p = 0,0022$) entre los controles de solución salina y los perros vacunados con p68.

Discusión

El estudio se diseñó para demostrar la seguridad y la eficacia de una vacuna de 15 µg/dosis de p68 de *Bordetella* en perros.

La seguridad se analizó usando las observaciones en el lugar de la inyección y de la temperatura rectal. El análisis de las mediciones de la reacción en el lugar de la inyección demostró una reacción insignificante en el grupo vacunado IM y reacciones mínimas en el grupo vacunado SC. Las reacciones que se observaron tendían a ser pequeñas, en general de tamaño decreciente durante los periodos de observación. El tamaño de estas reacciones muy probablemente pasaría inadvertido en perros sin afeitar. Aunque se observó una diferencia significativa entre la solución salina y la vacunación el día 21 y entre los vacunados IM y SC el día 24, las temperaturas rectales eran clínicamente no importantes y estaban dentro de los límites para todos los perros en todos los grupos.

La eficacia se analizó usando las observaciones de la medición de los títulos finales de p68 en ELISA y la tos. Con independencia de la vía de administración se demostró una buena respuesta de anticuerpos a p68 en los grupos vacunados con p68 el día 35. Se observó una buena respuesta anamnésica en perros vacunados tras la exposición. Aunque tradicionalmente se han obtenido respuestas de anticuerpos más altas con la vía IM más vascular y menos grasa en comparación con la vía SC, la diferencia entre los vacunados con p68 SC e IM no fue significativa a lo largo del curso del estudio.

El análisis de la respuesta de SAA en los perros vacunados con p68 de *Bordetella* y no vacunados tras la exposición indicó una elevación mucho menor en los valores de SAA en los grupos de animales vacunados, especialmente los días 1, 3 y 5 tras la exposición.

Conclusiones

En este estudio se analizó la eficacia de una vacuna de p68, 15 µg/dosis, de *Bordetella* canina usando un modelo de exposición canino 24 días después de la exposición. La vacuna era segura, tal como lo demuestran las temperaturas rectales normales, la aparición de reacciones mínimas en el lugar de la inyección, y la eficacia se demostró en los grupos combinados de IM y SC. La comparación de los valores de SAA demostró una diferencia significativa entre los perros vacunados con solución salina y con p68 los días 1, 3 y 5 tras la exposición al aerosol.

Ejemplo 3

DURACIÓN DE SEIS MESES DEL ESTUDIO DE INMUNIDAD DE LA VACUNA DE p68 DE BORDETELLA CANINA

Animales

Se adquirieron noventa perros machos y hembras de raza mixta y la mayoría de los cachorros tenían 9 semanas ($\pm$ 1 semana) el día de la primera vacunación.

Se administró una vacuna contra el parvovirus MLV a todos los cachorros a su llegada al centro del estudio. Para ser aptos para el estudio, se determinó que los animales eran negativos para *B. bronchiseptica* mediante exudado traqueal y el título de aglutinación. Durante el estudio no se administró ninguna otra vacuna, aparte de los productos experimentales.

Se mantuvo a los perros en una instalación de aislamiento, necesario para prevenir la exposición a *B. bronchiseptica* y a otros patógenos caninos antes de la exposición. Después de la exposición mediante aerosol *B. bronchiseptica* se continuaron los procedimientos de aislamiento para prevenir la exposición a otros patógenos caninos.

Vacunas

En los grupos de tratamiento T01 y T02 se usó solución salina estéril como vacuna placebo. La vacuna de p68 recombinante canina de *Bordetella Bronchiseptica* se usó en los grupos de tratamiento T03 y T04. El gen estructural del antígeno p68 se clonó en *Escherichia coli* y la expresión del gen se reguló mediante un promotor sensible a la temperatura. Las células se lisaron y los cuerpos de inclusión se separaron mediante centrifugación. El p68 recombinante en los cuerpos de inclusión se solubilizó mediante tratamiento con SDS. Por separado, 15 µg de p68 y 60 µg de p68 se combinaron con 50 µg de Quil A y 50 µg de colesterol por ml en solución salina de Lepto estéril como diluyente. Los componentes combinados se mezclaron a 4 °C durante 24 horas y se pasaron tres veces por un microfluidificador. Cada dosis de un ml contenía 2,7 µl de etanol y 0,0001 % de timersol. Las concentraciones de p68 en las vacunas experimentales se midieron mediante ELISA de p68. Todos los ensayos se realizaron por duplicados de cinco (5). Todas las vacunas se usaron en un plazo de 6 meses desde su preparación.

Inóculo de exposición

Placas de agar Bordet-Genou se sembraron con *Bordetella bronchiseptica*, cepa Bihr Cat, y se incubaron durante 48 horas a $37,5 \pm 2,5$ °C. Las colonias virulentas de la fase I se seleccionaron y se sembraron mediante raspado en

agar Bordet-Genou y se incubaron durante 24 horas a $37,5 \pm 2,5$ °C. Tras la incubación se usó solución salina de Bordetella para lavar las colonias del agar y las células se diluyeron hasta una densidad óptica de 0,80 a 600 nm. Se realizó un recuento de células antes y después de la exposición para confirmar la lectura del nefelómetro. La concentración diana para exposición fue de aproximadamente 1×10^9 UFC. Para el grupo I, el recuento de la concentración antes de la exposición fue de $1,94 \times 10^9$ y el recuento de la concentración postexposición fue de $1,43 \times 10^9$. Para el grupo II el recuento de la concentración antes de la exposición fue de $2,55 \times 10^9$ y el recuento de la concentración postexposición fue de $2,13 \times 10^9$.

Diseño del estudio

Tabla resumen

Grupo de tratamiento	Tratamiento	Vía	Número de animales Día de la primera vacunación		
			Día 0 (grupo I)	Día 20 (Grupo II)	Número total de animales
T01	Control salino	Subcutánea	8	7	15
T02	Control salino	Intramuscular	8	7	15
T03	p68 60 µg/dosis	Subcutánea	8	7	15
T04	p68 60 µg/dosis	Intramuscular	8	7	15
T05	p68 15 µg/dosis	Subcutánea	8	7	15
T06	p68 15 µg/dosis	Intramuscular	8	7	15

El estudio se realizó en dos fases o grupos, compuestos por 48 perros en el Grupo I y 42 perros en el Grupo II.

La vacunación nº 1 se realizó el día 0 para cada grupo. La vacunación nº 2 se produjo 20 días después. Los acontecimientos del grupo I se desviaron de los acontecimientos del grupo II en aproximadamente 15 días. Los perros fueron expuestos al aerosol de *B. bronchiseptica* 181 días después de la última vacunación.

Aleatorización/Enmascaramiento

Los animales fueron asignados aleatoriamente a tratamientos y cuartos de acuerdo con un diseño de aleatorización completa.

Durante el periodo de tiempo desde la vacunación nº 1 hasta el día de la exposición en cada grupo de estudio, los animales fueron asignados de forma aleatoria a tratamientos y cuartos (3 a 5 perros por cuarto) usando un plan de aleatorización.

El día de la exposición, los animales tratados previamente se aleatorizaron a los cuartos de exposición dentro del grupo de estudio usando un diseño de bloque generalizado.

Individuos cualificados, que no conocían los grupos de tratamiento asignados, realizaron ensayos microbiológicos y serológicos, y evaluaciones de la tos y de los lugares de la inyección.

Análisis de Datos

Las variables de la respuesta a la vacunación consistían en los datos del lugar de la inyección, las temperaturas rectales y los títulos en el ELISA de p68. Los datos del lugar de la inyección se resumieron del siguiente modo: 1) número de animales que tienen una reacción medible por tratamiento y día de estudio, 2) número de puntos de tiempo del animal que tiene una reacción medible por tratamiento, 3) número de animales que tiene una reacción medible por tratamiento en cualquier punto de tiempo por tratamiento, 4) duración de una reacción medible para cada animal.

Por separado de la primera y la segunda vacunación, los datos del volumen del lugar de la inyección (cm cúbicos), las temperaturas rectales y del log natural transformada del título de ELISA p68 se analizaron usando un modelo mixto lineal general.

Se construyeron contrastes lineales *a priori* del tratamiento por media de mínimos cuadrados del punto de tiempo de observación para analizar las diferencias del grupo de tratamiento en cada punto de tiempo de observación y comparar los puntos de tiempo dentro de cada tratamiento. Las comparaciones específicas de interés fueron T01 vs. T03, T01 vs. T05, T03 vs. T05, T02 vs. T04, T02 vs. T06 y T04 vs. T06. Si el término de interacción del punto de tiempo por tratamiento por grupo de estudio era significativo a $P < 0,05$, los contrastes entre los grupos de tratamiento en cada punto de tiempo y entre los puntos de tiempo dentro de los grupos de tratamiento estaban dentro de cada grupo de estudio, de lo contrario estos contrastes se basaron en la media de mínimos cuadrados del efecto de interacción por punto de tiempo por tratamiento. Para todas las comparaciones se usó un nivel de significación del 5 %.

Las variables de la respuesta postexposición consistían en los títulos de ELISA p68, los títulos de amiloide sérico A y

las observaciones diarias de la tos. Los títulos de ELISA p68 post exposición se analizaron como se ha descrito previamente. Para los datos de los títulos de amiloide sérico A (SAA) tras la exposición se aplicó la transformación log natural a los valores del título antes del análisis usando un modelo mixto lineal general.

- 5 El análisis de la tos se modificó para reflejar los requisitos de la USDA. Para cada perro, se calculó el porcentaje de los periodos de observación durante los que se observó tos. Antes del análisis, el porcentaje se transformó usando la transformación de la raíz cuadrada del arcoseno. Para el análisis de la tos se usó un modelo mixto lineal general.

La media de mínimos cuadrados de este análisis se retrotransformó en los porcentajes y el porcentaje de reducción de la tos se calculó como:

Reducción del porcentaje= $\frac{100 \times (\text{media del grupo control} - \text{media del grupo de tratamiento})}{(\text{media del grupo control})}$

- 10 Se construyeron contrastes lineales *a priori* de la media de mínimos cuadrados del tratamiento para analizar las diferencias por grupo de tratamiento. Las comparaciones específicas de interés fueron T01 vs. T03, T01 vs. T05, T03 vs. T05, T02 vs. T04, T02 vs. T06, y T04 vs. T06. Si el término de interacción tratamiento por grupo de estudio era significativo a $P < 0,05$, los contrastes entre los grupos de tratamiento en cada grupo de estudio, de lo contrario
15 estos contrastes se basaron en la media de mínimos cuadrados del efecto principal del tratamiento. Para todas las comparaciones se usó un nivel de significación del 5 %.

Procedimiento del estudio

Procedimientos detallados del animal

- 20 Antes de la llegada a las instalaciones del estudio y antes de la primera vacunación, se obtuvo un exudado traqueal de los cachorros para cultivo de *B. bronchiseptica* y se extrajo sangre para los títulos de aglutinación. Todos los animales dieron negativo en el exudado traqueal y eran serológicamente negativos a *Bordetella*, y se estimó que eran aptos para el estudio. Cuarenta y ocho cachorros se asignaron aleatoriamente a uno de seis grupos de tratamiento para el grupo I. El procedimiento se repitió usando cuarenta y dos perros para el grupo II. Se aclimató a los animales al centro de estudio durante al menos cinco días.

- 25 Los grupos y tratamientos se detallan en la sección 7.4.A. Debido a las restricciones de la instalación y para potenciar la precisión de las observaciones de tos tras la exposición, la vacunación y los respectivos periodos de exposición se fraccionaron en 15 días para generar los dos grupos de perros. El día 0 se refiere al día de la vacunación nº 1 para los Grupos I y II. El día 0 se refiere al día de la vacunación nº 1 para los Grupos I y II. Los tratamientos T01, T03 y T05 se administraron por vía subcutánea. Los tratamientos T02, T04, y T06 se
30 administraron por vía intramuscular. Las inyecciones subcutáneas se administraron en la cara dorsolateral del cuello. Para la primera vacunación se usó el lado derecho del cuello y para la segunda vacunación se usó el lado izquierdo del cuello. Las inyecciones intramusculares se administraron en el músculo semimembranoso derecho e izquierdo para la primera vacunación y la segunda vacunación, respectivamente. Todos los lugares de la inyección se midieron en tres dimensiones durante siete días tras cada vacunación con una medición de seguimiento realizada 14
35 días después de la vacunación. Las temperaturas rectales se monitorizaron el día de la vacunación (antes de la vacunación) y durante tres días tras cada vacunación. La sangre se extrajo antes de cada vacunación (el día -1 y el día 19) y el día 50 para la determinación de los títulos de p68 ELISA.

- Cada mes se realizó un exudado traqueal de todos los perros para cultivo de *B. bronchiseptica* en sedación para confirmar el estado negativo para *B. bronchiseptica*. También se extrajo sangre para los títulos de aglutinación y ELISA. El procedimiento se repitió 7 días antes de la exposición para cada grupo. Signos de cultivo de exudado
40 traqueal positivo o una elevación del título de aglutinación eran motivo de exclusión del animal del estudio.

- La exposición se administró a los perros 181 días después de la segunda vacunación. Los perros sedados fueron expuestos usando un cono nasal desechable, que se ajustó bien sobre el hocico del perro sedado. El cono nasal se fijó a un nebulizador que estaba fijado a una bomba de presión de vacío fijada a 0,04 a 0,041 MPa. Un ml del
45 material de exposición se introdujo en el nebulizador y el material de exposición aerosolizado se administró a cada perro durante 4 minutos.

- Las observaciones de tos postexposición se modificaron antes de la exposición para cumplir las recomendaciones de la USDA. Después de la exposición, se observó a cada grupo de perros entre el tercero y el décimo día tras la exposición, durante un total de 8 días. Se observó a los animales dos veces al día por tos durante aproximadamente
50 45 minutos en cada periodo de observación. El intervalo entre los periodos de observación fue de aproximadamente 12 horas. El personal que realizaba las observaciones de la tos desconocía las asignaciones de los grupos de tratamiento.

Obtención de sangre

La sangre para los títulos de aglutinación se obtuvo antes de la primera vacunación, mensualmente y antes de la

exposición para cada grupo.

La sangre para la evaluación de anti-p68 ELISA se obtuvo el día antes de la vacunación nº 1 y nº 2 el día 50 y a intervalos de aproximadamente de 30 días después para cada grupo. También se obtuvieron sangre el día de la exposición y el último día de la observación postexposición.

- 5 Se extrajo sangre para el ensayo de los niveles de amiloide sérico A (SAA) el día de la exposición (antes de la exposición) y a los 1, 3, 5, 7 y 9 días de la exposición para cada grupo.

Pruebas realizadas con las muestras

- 10 Se evaluaron los exudados traqueales para detectar la presencia de *B. bronchiseptica* mediante cultivo. Cada exudado traqueal se sembró sobre una placa de agar selectivo para *Bordetella*. Se incluyeron controles positivos y negativos. Las placas se incubaron a $37,5 \pm 2,5$ °C durante 48 ± 4 horas. Las colonias resultantes en cada placa se compararon con el control positivo y cualquier colonia que pareciera idéntica al control positivo se analizó después para confirmar la presencia de *B. bronchiseptica*. Las pruebas conformacionales incluyeron el uso de TSI, citrato y agar urea y medio con rojo nitrato.

- 15 Los sueros se evaluaron para detectar los títulos de aglutinación, análisis de ELISA p68 o análisis de SAA usando los procedimientos siguientes.

- 20 Títulos de aglutinación- Los sueros se diluyeron en serie en placas de microtitulación usando solución salina de *Bordetella*. En cada placa se incluyeron controles positivos o negativos. La cepa 87 (cultivada en agar Bordet Genou, recogida, inactivada y diluida al 20 % T a 630 nm) se usó como antígeno de aglutinación y se añadió a cada pocillo. Las placas se agitaron e incubaron a 35 ± 2 °C durante 2 horas. Las placas se leyeron después de una segunda incubación a temperatura ambiente durante 22 horas. El título final se determinó usando el último pocillo para mostrar 50 % de aglutinación.

- 25 Títulos de ELISA p68 - El antígeno p68 recombinante se capturó en una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con un antisuero policlonal específico del antígeno p68 de *Bordetella*. A la placa se añadieron diluciones en serie al doble del suero canino y se incubó. En cada placa se incluyeron controles positivos y negativos a una dilución de 1:1000. Se usó un conjugado indicador de IgG anti-perro de cabra purificado por afinidad marcado con peroxidasa para detectar anticuerpos específicos para el antígeno p68. Después se añadió un sustrato ABTS cromogénico y se leyó la placa cuando los pocillos control positivo tenían una DO de $1,2 \pm 0,2$. Se calculó el título de una muestra dada como el recíproco de la última dilución con una densidad óptica superior a la media de la dilución de suero control negativo más cinco desviaciones estándar.

- 30 Títulos de SAA- El amiloide sérico A canino se capturó en una placa de microtitulación de 96 pocillos recubierta con un anticuerpo monoclonal anti-SAA canino. A la placa se añadieron muestras diluidas del suero canino y se incubó. Se añadió un patrón de referencia para obtener una curva estándar de 0, 31 µg/ml a 20 ng/ml. Se añadió un conjugado de anticuerpo anti-canino marcado con biotina. Tras la incubación del anticuerpo anti-canino marcado con biotina se añadió un conjugado de estreptavidina con peroxidasa. Se añadió un sustrato cromogénico TMB y la placa se leyó tras 30 minutos. La concentración de amiloide sérico A se determinó mediante comparación de la muestra con la curva estándar y la multiplicación por el factor de dilución adecuado.

Resultados

A menos que se indique lo contrario, los resultados son los datos combinados del grupo I y II.

Cultivo del exudado traqueal y títulos de aglutinación

- 40 Se demostraron cultivos positivos del exudado traqueal y/o títulos de aglutinación en aumento en once perros durante el curso del estudio. Estos perros y cualquier perro estabulado con los perros positivos fueron retirados del estudio, lo que tuvo como resultado una pérdida de 20 perros. El número de perros retirados de cada grupo fue: T01-4 perros, T02-2 perros, T03-3 perros, T04-1 perro, T05-5 perros, T06-5 perros.

Observaciones en el lugar de la inyección

- 45 Las reacciones en el lugar de la inyección se resumen en las Tablas 22-25. No se recogió información del lugar de la inyección para el perro 81595 el día 21 para el grupo I debido a restricciones técnicas. El protocolo se modificó de modo que los datos de reacción en el lugar de la inyección no se recogieran para los perros del grupo II el día 22, por tanto el resumen de los datos del día 22 sólo contiene información de los ocho perros por grupo de tratamiento en el Grupo I. No se observaron reacciones en el lugar de la inyección para ningún perro que recibiera tratamiento IM. Las mediciones en el lugar de la inyección fueron mínimas para los grupos de tratamiento de vacunados SC (T03 y T05).

Tabla 22. Media de mínimos cuadrados (cm cúbicos) de las reacciones en el lugar de la inyección en perros tras vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (tras la primera vacunación^a)

Tratamiento	Tamaño medio (cm cúbicos) ^b							
	Día de estudio							
	1	2	3	4	5	6	7	14
T01 salino SC	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 salino IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	5,8	6,4	7,3	6,3	5,0	4,9	2,7	0
T04 60 µg IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	4,4	4,6	3,1	2,1	1,2	0,9	0,7	0
T06 15 µg IM	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Vacunación n° 1 administrada el día 0

^b Error estándar para todas las medias = 0,64

5

Tabla 23. Media de mínimos cuadrados (cm cúbicos) de las reacciones en el lugar de la inyección en perros tras vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (tras la segunda vacunación^a)

Tratamiento	Tamaño medio (cm cúbicos) ^b							
	Día de estudio							
	21 ^b	22 ^c	23 ^b	24 ^b	25 ^b	26 ^b	27 ^b	34 ^b
T01 salino SC	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 salino IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	5,0	3,2	4,2	5,8	5,9	5,8	4,3	0
T04 60 µg IM	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	3,7	2,4	2,2	2,6	2,1	2,0	1,6	0
T06 15 µg IM	0 ^d	0	0	0	0	0	0	0

^a Vacunación n° 2 administrada el día 20

^b Error estándar para las medias este día = 0,55

^c Error estándar para las medias este día = 0,70

^d Error estándar para T06 el día 21= 0,57

Tabla 24. Porcentaje de perros que tienen una reacción en el lugar de la inyección medible tras vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (tras la primera vacunación^a)

Tratamiento	Porcentaje de reacción medible								
	n	1	2	3	4	5	6	7	14
T01 sa lino SC	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 sa lino IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	15	66,7	73,3	73,3	73,3	73,3		66,7	0
T04 60 µg IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	15	73,3	73,3	60,0	60,0	53,3	46,7	46,7	0
T06 15 µg IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0

^a Vacunación n° 1 administrada el día 0

10

Tabla 25. Porcentaje de perros que tienen una reacción en el lugar de la inyección medible tras vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (tras la segunda vacunación^a)

Tratamiento	n	Porcentaje de reacción medible							
		Día del estudio							
		21	22 ^b	23	24	25	26	27	34
T01 sa lino SC	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T02 sa lino IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T03 60 µg SC	15	80,0	50,0	66,7	66,7	80,0	80,0	80,0	6,7
T04 60 µg IM	15	0	0	0	0	0	0	0	0
T05 15 µg SC	15	73,3	50,0	73,3	73,3	73,3	73,3	66,7	0
T06 15 µg IM	15	0 ^c	0	0	0	0	0	0	0

^a Vacunación nº 2 administrada el día 0^b n= 8 el día 22^c n=14 para T06 el día 21

5 En la Tabla 26 se resumen las diferencias significativas en las mediciones de los lugares de la inyección. Se observó una diferencia significativa en las mediciones de los lugares de la inyección entre T01 (salino SC) frente a T03 (60 µg SC) durante siete días tras la primera vacunación. Se observó una diferencia significativa entre T01 (salino SC) y T05 (15 µg SC) sólo durante los primeros cuatro días después de la primera vacunación. Desde el día 3 al 7 se encontró una diferencia significativa entre T03 (60 µg SC) y T05 (15 µg SC). El día 14 (la observación de reevaluación de dos semanas) no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

10 Se observó una diferencia significativa (P= 0,0138) en las mediciones de los lugares de la inyección entre T01 (salino SC) frente a T03 (60 µg SC) y T05 (15 µg SC) durante siete días tras la segunda vacunación. Desde el día 23 al 27 se encontró una diferencia significativa entre T03 (60 µg SC) y T05 (15 µg SC). El día 34 (la observación de reevaluación de dos semanas) no se observaron diferencias significativas entre ninguno de los grupos.

15 **Tabla 26. Valores de significación para contrastes *a priori* entre la media de mínimos cuadrados de las mediciones de la reacción en el lugar de la inyección.**

Día del estudio	Contrastes (tratamiento frente a tratamiento)	Valor P
1	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0001
2	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0001
3	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0006
4	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0214
5	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0001
6	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0001
7	T01 v T03	0,0031
	T01 v T05	0,0258
21	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0001
22	T01 v T03	0,0010
	T01 v T05	0,0166
23	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0055
	T03 v T05	0,0113
24	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0008
	T03 v T05	0,0001

(cont.)

25	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0067
	T03 v T05	0,0001
26	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0104
	T03 v T05	0,0001
27	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0475
	T03 v T05	0,0004

Sólo se presentan los contrastes significativos ($P < 0,05$).

Temperatura rectal

- 5 Las mediciones de la temperatura rectal se resumen en las Tablas 27 y 28. El protocolo se modificó de modo que no se recogieran datos de la temperatura rectal para los perros del grupo II el día 22, por tanto el resumen de los datos del día 22 contiene únicamente información de los perros por grupo de tratamiento en el Grupo I.

Tabla 27. Media de mínimos cuadrados de la temperatura rectal (° C) en perros tras la vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (tras la primera vacunación^a)

Tratamiento	Temperatura rectal (° C) ^b			
	Día del estudio			
	0	1	2	3
T01 salino SC	38,5	38,4	38,3	38,2
T02 salino IM	38,4	38,2	38,4	38,2
T03 60 µg SC	38,4	38,5	38,2	38,3
T04 60 µg IM	38,4	38,5	38,4	38,4
T05 15 µg SC	38,5	38,5	38,2	38,2
T06 15 µg IM	38,5	38,4	38,3	38,4

^a Vacunación nº 1 administrada el día 20

^b Error estándar = 0,09

- 10 **Tabla 28. Media de mínimos cuadrados de la temperatura rectal (° C) en perros tras la vacunación con solución salina o p68 de Bordetella (tras la segunda vacunación^a)**

Tratamiento	Temperatura rectal (° C) ^b			
	Día del estudio			
	20 ^b	21 ^b	22 ^c	23 ^b
T01 salino SC	38,6	38,5	38,3	38,4
T02 salino IM	38,6	38,6	38,3	38,4
T03 60 µg SC	38,7	38,6	38,6	38,4
T04 60 µg IM	38,8	38,7	38,5	38,5
T05 15 µg SC	38,6	38,6	38,5	38,4
T06 15 µg IM	38,7	38,7	38,4	38,5

^a Vacunación nº 2 administrada el día 20

^b Error estándar = 0,08

^c Error estándar = 0,11

- 15 Se observó una diferencia significativa en las temperaturas rectales entre T02 (solución salina IM) y T04 (60 µg IM) el día 1 tras la primera vacunación. No se observaron diferencias significativas en las temperaturas rectales entre cualquiera de los grupos cualquier día tras la segunda vacunación.

Títulos de p68 en ELISA

- 20 Los datos de ELISA de p68 preexposición se resumen en la Tabla 29. Debido a la respuesta de los perros del grupo I en T06 el día 19 se observó un efecto debido al grupo en el análisis de los datos de los títulos de ELISA p68. El efecto fue pequeño y no influyó sobre otros puntos de tiempo analizados. Por tanto, los datos del Grupo I y II se combinan con fines de notificación.

Debido a la considerable respuesta de títulos a p68 en los perros vacunados se usaron varios mínimos de titulación a diferentes puntos de tiempo en el estudio. Las titulaciones para los días -1 y 19 comenzaron a 50. Para los días 50 a 195, las titulaciones comenzaron a 2 00. Las titulaciones para las muestras obtenidas los días 201 y 211

comenzaron a 1000. Cualquier valor indicado como “menor que” se dividió por dos antes del análisis. El aumento incremental observado en los valores de p68 ELISA para los grupos control (T01 y T02) durante el curso del estudio se debe a estos valores mínimos de titulación. Los títulos de aglutinación, excepto los indicados anteriormente, permanecieron < 4.

- 5 Todos los perros vacunados con placebo presentaron títulos de p68 < 200 el día 50. Todos los animales vacunados con p68 mostraron al menos un incremento por cuatro de los títulos después de la segunda vacunación (día 0 frente a día 50) cuando se comparó con los animales vacunados con placebo.

Tabla 29. Media geométrica y errores estándar de los títulos finales de ELISA de p68 en perros tras vacunación con p68 de Bordetella el día 0 y el día 20.

Tratamiento		Día del estudio					
		-1 ^a		19 ^a		50 ^b	
		Media	Error est.	Media	Error est.	Media	Error est.
T01	Salino SC	31,4	5,06	30,5	4,92	100,0	16,14
T02	Salino IM	27,7	4,47	25,0	4,03	100,0	16,14
T03	P68 60 µg SC	29,8	4,80	507,6	81,92	10633,5	1715,94
T04	P68 60 µg IM	26,7	4,31	249,7	40,29	4722,2	762,02
T05	P68 15 µg SC	25,0	4,03	268,7	43,36	5622,8	907,35
T06	P68 15 µg IM	33,4	5,40	91,8	14,81	3528,9	569,46

^aLas titulaciones para los días -1 y 19 comenzaron a 50. Cualquier valor indicado como “menor que” se dividió por dos antes del análisis.

^bLas titulaciones para el día 50 comenzaron a 200. Cualquier valor indicado como “menor que” se dividió por dos antes del análisis.

- 10 Las diferencias significativas para la media de mínimos cuadrados de los títulos de ELISA posvacunación se indican en la Tabla 30. No se observaron diferencias significativas en los títulos de ELISA P68 entre los controles SC y los animales vacunados SC o los controles IM y los vacunados IM antes de la vacunación (Día -1).

Tabla 30. Valores de significación para contrastes *a priori* entre la media de mínimos cuadrados posvacunación de los títulos de p68 ELISA.

Día del estudio	Contraste	Valor p
19	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0001
	T02 v T04	0,0001
	T02 v T06	0,0001
	T03 v T05	0,0061
	T04 v T06	0,0001
50	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0001
	T02 v T04	0,0001
	T02 v T06	0,0001
	T03 v T05	0,0059
Sólo se presentan los contrastes significativos (P< 0,05).		

- 15 Los títulos de ELIS p68 medidos durante el curso del estudio se resumen en la Tabla 31 y se ilustran en la Figura 3.

- 20 Durante el curso del estudio se realizaron todos los intentos para coordinar las actividades entre los grupos I y II. Para los puntos de tiempo de recolección de datos centrales (es decir, acontecimientos que rodean a la vacunación y la exposición) se consiguió. En tres casos durante el estudio, la obtención de sangre y del exudado traqueal varió en 1 o 2 días entre grupos. Con el fin de resumir y comunicar los datos del ELISA p68 para este periodo intermedio, se combinaron los datos de estos días. Por tanto, el día 79 contiene datos combinados del día 79 (grupo I) y el día 81 (grupo II), e día 111 corresponde al día 110 (grupo II) y el día 111 (grupo I) y el día 169 corresponde al día 169 (grupo II) y el día 170 (grupo I). Según el protocolo, no se realizó análisis de datos con datos del ELISA p68 más allá del día 50.

25

Tabla 31. Resumen de la media geométrica de los títulos finales del ELISA del p68 en perros no vacunados y vacunados frente a p68 de Bordetella tras vacunación y exposición a aerosol con *Bordetella bronchiseptica*.

Tratamiento		Media geométrica de los títulos de ELISA P68 ^a						
		Día del estudio ^{b,c}						211
		79	110	140	169	195	201	
T01	Salino SC	100,00	154,92	106,00	108,59	117,18	109,14	500,0
T02	Salino IM	112,85	145,33	130,61	115,51	113,43	112,37	500,0
T03	60 µg SC	3434,24	2884,97	1861,64	1895,56	3097,24	2408,61	81564,79
T04	60 µg IM	1508,60	1164,81	933,12	987,64	1142,01	1547,87	59940,47
T05	15µg SC	1699,20	1511,80	1229,35	1312,62	2248,63	2244,47	29869,29
T06	15 µg IM	974,18	916,21	573,51	876,15	1505,01	1458,16	11503,28

^aLas titulaciones para los días 50 a 195 comenzaron a 200. Las titulaciones para las muestras obtenidas los días 201 y 211 comenzaron a 1000. Cualquier valor indicado como "menor que" se dividió por dos antes del análisis.

^b Las vacunaciones n° 1 y 2 se administraron los días 0 y 20, respectivamente. La exposición se administró el día 201.

^cDurante el curso del estudio se realizaron todos los intentos para coordinar las actividades entre los grupos I y II. En los tres casos, la obtención de sangre para los grupos varió en 1 o 2 días. Los datos de estos días se combinaron para el resumen de datos. No se realizó análisis con los valores de los títulos de ELISA p68 más allá del día 50. El día 79 corresponde a los días 79 y 81, el día 110 corresponde a los días 110 y 111, el día 169 corresponde a los días 169 y 170.

Observaciones de tos

- 5 La exposición al aerosol para ambos grupos 18 días después de la segunda vacunación. Para cumplir las recomendaciones de la USDA, se modificaron los criterios para la tos a observaciones de aproximadamente 45 minutos, separadas por aproximadamente doce horas, del tercer al octavo día tras la exposición. Las observaciones de tos se resumen en las **Tablas 32 y 33**.

Tabla 32. Porcentaje medio de puntos de tiempo con tos en perros no vacunados y en perros vacunados con p68 de Bordetella tras la exposición en aerosol a *Bordetella bronchiseptica*

	Tratamiento	Número de perros	Media	Error est.
T01	Salino SC	11	75,44%	7,73
T02	Salino IM	13	80,50%	6,64
T03	p68 60 µg SC	12	67,30%	8,12
T04	p68 60 µg IM	14	71,81%	7,32
T05	p68 15µg SC	10	36,30%	9,19
T06	p68 15 µg IM	10	39,55%	9,18

Tabla 33. Porcentaje medio de puntos de tiempo con tos por tratamiento en perros no vacunados y en perros vacunados con p68 de Bordetella tras la exposición en aerosol a *Bordetella bronchiseptica*

Parámetro	Estimación	Error est.
Media salino (T01 y T02)	78,26%	5,28
60 µg/dosis, media (T03 y T04)	69,58%	5,68
15 µg/dosis, media (T05 y T06)	37,92%	6,70

- 15 El porcentaje de reducción en la tos en comparación con el control salino fue 51,55 % para los grupos de 15 µg/dosis y 11,09 % para los grupos de 60 µg/dosis. Las diferencias estadísticas significativas se resumen en la Tabla 34.

Tabla 34. Valores de significación para los contrastes *a priori* entre la media de mínimos cuadrados para el porcentaje de puntos de tiempo con tos

Contraste	Valor p
T01 v T05	0,0041
T03 v T05	0,0199
T02 v T06	0,0019
T04 v T06	0,0119
T01 y T02 v T05 y T06	0,0001

(Sólo se presentan los contrastes significativos ($P < 0,05$)).

Amiloide sérico A

Los valores de SAA se determinaron los días 0, 1, 3, 5, 7 y 9 tras la exposición. Los valores de amiloide sérico A se presentan en la **Tabla 35** y se representan en la **Figura 4**.

5 **Tabla 35: Media geométrica y errores estándar de los títulos de amiloide sérico A en perros no vacunados y en perros vacunados con p68 de Bordetella tras la exposición en aerosol a Bordetella bronchiseptica**

TX	Media geométrica y errores estándar del amiloide sérico A ^a											
	Día del estudio											
	201		202		204		206		208		210	
	Media	Error est.	Media	Error est.	Media	Error est.	Media	Error est.	Media	Error est.	Media	Error est.
T01	1,1	0,33	257,3	84,61	371,6	116,44	548,7	171,93	68,0	21,31	9,4	2,95
T02	1,0	0,28	114,0	32,83	111,9	32,21	108,9	31,36	15,6	4,48	1,7	0,49
T03	0,8	0,25	135,7	40,55	119,7	35,75	74,5	22,25	10,9	3,38	1,0	0,30
T04	0,8	0,23	134,7	39,20	156,0	43,59	174,8	48,86	34,6	9,67	1,9	0,54
T05	0,8	0,28	68,4	22,85	88,3	29,50	9,3	3,12	1,9	0,64	2,0	0,66
T06	0,8	0,27	45,7	14,94	54,0	17,67	9,4	3,07	1,9	0,63	0,8	0,27

^aExposición administrada el día 201.

Las diferencias significativas en los títulos de SAA se resumen en la Tabla 36.

10 **Tabla 36. Valores de significación para contrastes *a priori* entre la media de mínimos cuadrados de los títulos de amiloide sérico A postexposición.**

Día del estudio	Contraste (tratamiento v tratamiento)	Valor p
202	T01 v T05	0,0054
	T02 v T06	0,0393
	T04 v T06	0,0154
204	T01 v T03	0,0097
	T01 v T05	0,0020
	T04 v T06	0,0154
206	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0001
	T02 v T06	0,0001
	T03 v T05	0,0001
	T04 v T06	0,0001
208	T01 v T03	0,0001
	T01 v T05	0,0001
	T02 v T06	0,0001
	T03 v T05	0,0023
	T04 v T06	0,0001
210	T01 v T03	0,0002
	T01 v T05	0,0068

Sólo se presentan los contrastes significativos ($P < 0,05$)).

Discusión

15 El estudio se diseñó para demostrar la seguridad y la eficacia a seis meses de una vacuna recombinante de p68 de Bordetella en perros. Se ha demostrado la seguridad de las vacunas de 15 µg/dosis y de 60 µg/dosis. El estudio avaló la eficacia y la duración de 6 meses de la inmunidad de la vacuna de 15 µg/dosis.

20 La seguridad se analizó usando las observaciones en el lugar de la inyección y de la temperatura rectal. El análisis de las mediciones de la reacción en el lugar de la inyección demostró ausencia de reacciones en los grupos vacunados IM y reacciones mínimas los grupos vacunados con 15 µg/dosis y de 60 µg/dosis SC. Las reacciones que se observaron tendían a ser pequeñas en los perros vacunados con 15 µg/dosis SC. Dichas reacciones observadas fueron transitorias que, en general, se resolvían en 14 días o menos. El tamaño de estas reacciones muy probablemente pasaría inadvertido en los perros en los que no se hubiera afeitado los lugares de la inyección. Las temperaturas rectales tras la vacunación fueron poco importantes y estaban dentro de los límites normales para todos los perros en todos los grupos.

La eficacia y la duración de la inmunidad se analizaron 181 después de la vacunación usando las observaciones de los títulos finales de p68 en ELISA. El porcentaje de títulos en los controles salinos (78,26 %) indicó que la exposición administrada a los animales del estudio era aceptable. El porcentaje de puntos de tiempo con títulos para el grupo de 15 µg/dosis (37,92 %) demostró una reducción de 51,55 % en los títulos en comparación con los controles, lo que satisface los requisitos de eficacia exigidos por la USDA. No se demostró protección en el grupo de 60 µg/dosis (69,58 %), mostrando los perros una reducción mínima de los títulos en comparación con los controles.

aunque no se compararon estadísticamente, a partir de las Tablas 29 y 31 se puede ver que los vacunados SC tendían a tener mayores respuestas de anticuerpo en comparación con los vacunados IM. Con fines de discusión, comentarios adicionales con respecto a los diferentes grupos de dosis combinan los resultados de las vías de administración IM y SC.

Con independencia de la vía de administración se demostró una excelente respuesta de anticuerpos a p68 en ambos grupos vacunados el día 50 y los vacunados la mantuvieron durante el curso del estudio. En los vacunados se observó una buena respuesta anamnésica tras la exposición.

La comparación de los títulos de p68 ELISA de 15 µg/dosis y 60 µg/dosis durante el curso del estudio indicó que el grupo de 60 µg/dosis mostraba una respuesta de título ligeramente mayor (Figura 3). Esta respuesta, aunque excelente, no se correlacionó con protección tras la exposición al aerosol. Las respuestas del título de ELISA p68 eran variables en los perros retirados del estudio con exudados traqueales positivos o títulos de aglutinación en aumento. Tres de los seis controles retirados del estudio con cultivos positivos del exudado traqueal y/o títulos de aglutinación en aumento mantuvieron títulos de p68 ELISA <200. Parece no existir correlación alguna entre títulos de p68 ELISA y el exudado traqueal o el estado del título de aglutinación de los perros retirados del estudio.

El análisis de la respuesta de SAA en los perros vacunados con p68 de Bordetella y no vacunados tras la exposición indicó una elevación mucho menor en los valores de SAA en los grupos de 15 µg/dosis, especialmente los días 5 y 7 tras la exposición.

Conclusiones

En este estudio se analizó la eficacia de una vacuna de p68, 15 µg/dosis y de 60 µg/dosis de Bordetella canina usando un modelo de exposición canino 6 meses después de la vacunación. Ambas vacunas eran seguras, lo que se demostró por la aparición de reacciones mínimas en el lugar de la inyección, temperaturas rectales normales y mínimas reacciones en el lugar de la inyección. Aunque los perros vacunados tanto con 15 µg/dosis como con 60 µg/dosis mostraron una buena respuesta serológica a la vacunación, media por los títulos de p68 ELISA, la respuesta no se correlacionó con protección clínica en los perros vacunados con 60 µg/dosis. Los perros vacunados con 60 µg/dosis no mostraron diferencias significativas en los títulos en comparación con los controles no vacunados. Se demostró buena eficacia de la vacuna de 15 µg/dosis por una reducción superior al 50 % de los títulos en comparación con los controles. Se ha postulado que niveles mayores de SDS en la vacuna de 60 µg/dosis pueden tener como resultado la diferencia demostrada en la protección. La comparación de los valores de SAA mostró una diferencia entre los vacunados y los controles.

Ejemplo 4

Seguridad y eficacia de VANGUARD® Plus 5/CV-L

VANGUARD® Plus 5/CV-L es una preparación liofilizada de cepas atenuadas del virus del CD, CAV-2, virus de CPI, CPV y cultivos enteros inactivados de *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae*, más una preparación líquida de CCV inactivada con un adyuvante. Todos los virus se propagaron en líneas celulares establecidas. La fracción de CPV se atenuó mediante pase bajo en la línea celular canina, que le dio propiedades inmunogénicas capaces de superar la interferencia de los anticuerpos maternos a los niveles indicados en la Tabla 38. El componente líquido se usó para rehidratar el componente liofilizado, que se había envasado con gas inerte en lugar de vacío.

La evaluación de laboratorio demostró que VANGUARD® Plus 5/CV-L inmunizaba a los perros contra la enfermedad respiratoria causada por CD, ICH, CAV-2 y CPI, la enteritis causada por CCV y CPV y la leptospirosis causada por *L. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae* y que no existía interferencia inmunológica entre las fracciones de la vacuna. Mediante ensayos de seguridad en campo amplios se mostró que era segura y esencialmente libre de reacciones en perros tan jóvenes como de 6 semanas de edad en condiciones normales de uso.

También se demostró que la vacuna contra CAV-2 protege de forma cruzada contra ICH causada por el CAV-1. Los estudios demostraron que CAV-2 no sólo protege contra ICH sino también contra la enfermedad respiratoria producida por el CAV-2. En los ensayos realizados no se recuperó el virus de exposición adenovirus canino de tipo 2 de perros vacunados con CAV-2.

La fracción de CPV en VANGUARD® Plus 5/CV-L se sometió a exhaustivas pruebas de seguridad y eficacia. En las pruebas de laboratorio y los ensayos clínicos en condiciones de campo normales se demostró que era segura y esencialmente sin reacciones. La seguridad del producto se demostró adicionalmente mediante un estudio de

retropase que incluyó la administración oral de múltiples dosis de la cepa de la vacuna a perros susceptibles, todos los cuales permanecieron normales.

La investigación demostró que 3 dosis de la vacuna con mayor título del virus CPV pueden superar los títulos de neutralización en suero (SN) asociados con los anticuerpos maternos. Otros investigadores han mostrado que los títulos de neutralización en suero tan bajos como de 1:4 interfieren en la inmunización activa usando vacunas vivas modificadas convencionales. Se realizó un ensayo clínico con cincuenta cachorros de 6 semanas de edad [25 vacunados (intervalo del título SN -256) y 25 controles no vacunados (intervalo del título SN 4-1024)] (**Tabla 37**). El grupo de vacunados recibió 3 dosis, administrándose las vacunaciones separadas por 3 semanas comenzando a las 6 semanas de edad. Tras 2 vacunación, 13/25 cachorros exhibieron un incremento por 4 o mayor del título SN de CPV (seroconversión) (**Tabla 38**). Doce de estos 13 cachorros tenían títulos SN maternos $\leq 1:16$ en el momento de la primera vacunación con el cachorro restante que tiene un título SN de 1:64. Otros 9 cachorros con títulos SN iniciales entre 1:16 y 1:256 se seroconvirtieron tras la segunda vacunación. Sus títulos SN de anticuerpos maternos habían disminuido a $\leq 1:64$ en el momento de la segunda vacunación. De forma similar, los últimos 3 vacunados, con títulos SN iniciales de 1:128 se seroconvirtieron tras la tercera vacunación, después de que su título de anticuerpos maternos frente a CPV había disminuido a $\leq 1:64$. Por tanto, en este estudio, cuando se administraron 3 dosis de vacuna a partir de las 6 semanas de edad, los 25 vacunados, incluso con los mayores niveles de anticuerpos maternos, quedaron activamente inmunizados (GM= 1:1176; intervalo de los títulos SN 128-4096). Los 50 perros fueron expuestos 3 semanas después de la tercera vacunación al virus de exposición CPV heterólogo. Catorce de 25 perros control no vacunados murieron o mostraron enfermedad lo bastante grave como para hacer necesaria la eutanasia, mientras que los 25 vacunados permanecieron esencialmente sanos. Por tanto, el virus de vacuna de pase bajo y título alto en VANGUARD® Plus 5/CV-L era altamente inmunogénico y capaz de estimular la inmunidad activa en presencia de anticuerpos maternos.

La eficacia de la fracción de CCV en VANGUARD® Plus 5/CV-L se demostró en un amplio estudio de exposición a la vacunación. Dieciséis cachorros de 7 a 8 semanas de edad fueron vacunados con VANGUARD® Plus 5/CV-L (vacunados) y 17 con Vanguard® Plus 5/L (controles). Todos los cachorros recibieron tres dosis de 1 ml a intervalos de 3 semanas. Tres semanas tras la tercera vacunación se expuso a los cachorros a una cepa virulenta de CCV (CV-6). Las observaciones clínicas, temperaturas, pesos y parámetros sanguíneos se monitorizaron durante 21 días tras la infección. Los vacunados con CCV mostraron una reducción en la aparición de diarrea y la cantidad de CCV virulento diseminado en comparación con los controles. A los 21 días de la exposición, la tinción con anticuerpos fluorescentes para CCV virulento de secciones de intestino delgado mostró una reducción significativa (P) de la antígeno CCV detectable entre los vacunados con CCV y los controles (**Tabla 39**).

Tabla 37. Títulos de neutralización sérica inicial (SN) de vacunados y controles

Títulos SN	Nº vacunados incluidos	Nº controles incluidos
<1:2	3	0
1:4	4	3
1:8	1	3
1:16	4	1
1:32	2	5
1:64	3	1
1:128	6	3
1:256	2	3
1:512	0	5
1:1024	0	1

Tabla 38. Media geométrica de los títulos de neutralización sérica posvacunación (SN) (Intervalo)^a

Grupos	N	Prevacunación	Posvacunación		
			1	2	3 ^b
Todos los perros vacunados	25	1:24 (<2-256)	1:108 (8-1024)	1:605 (8-4096)	1:1176 (128->4096)
Respondedores tras la 1ª vacunación	13	:6 (<2-64)	1:460 (64-1024)	1:1745 (256-4096)	1:1410 (256-4096)
Respondedores tras la 2ª vacunación	9	1:87 (16-256)	1:20 (8-64)	1:376 (256-1024)	1:1625 (256-4096)
Respondedores tras la 3ª vacunación	3	1:128 (128)	1:32 (16-64)	1:25 (8-64)	1:203 (128-256)
Perros control no vacunados	25	1:64 (4-1024)	1:9 (<2-64)	1:3 (<2-64)	<1:2 (<2-4)

^aPerros vacunados a las 6, 9 y 12 semanas de edad.

^bTítulos SN preexposición

Tabla 39. Tinción con anticuerpos fluorescentes de secciones de intestino delgado 21 días después de la exposición

	Sección de intestino	% Perros positivos para anticuerpos fluorescentes	
		Vacunados	Controles
Duodeno	1	0	89
	2	0	100
	3	0	100
	4	0	89
Yeyuno	5	0	100
	6	12,5	56
	7	0	78
Íleon	8	12,5	78
	9	0	67
	10	12,5	56

Conclusiones

- 5 En este estudio, se mostró que una vacuna de combinación adyuvada que contiene el virus del CD, CAV-2, el virus de CPI, CPV y cultivos enteros inactivados de *C. canicola* y *L. icterohaemorrhagiae* y CCV, era segura y eficaz como vacuna cuando se usó en cachorros. Asimismo se mostró que la vacuna de combinación superaba los títulos de neutralización en suero (SN) asociados con los anticuerpos maternos.

Ejemplo 5

10 ESTUDIO DE INMUNOGENICIDAD CON P68 NATIVO DE BORDETELLA CANINA

Animales

El estudio incluyó dos camadas de perros sabuesos SPF y dos camadas de perros de fuente aleatoria. Los perros fueron asignados aleatoriamente a grupos de vacunados y no vacunados. El estudio incluyó un total de 10 perros vacunados y 11 no vacunados.

15 Preparación de la vacuna experimental

- Se recogió *B. bronchispetica* (cepa 1 10H) de placas con agar sangre Bordet-Gengou de 48 horas lavando la superficie de la placa con de 5 a 10 ml de tampón de extracción por calor. Como alternativa, las células cultivadas en ambos cultivos (medio definido de Charlotte Parker) se recogieron mediante centrifugación, desechando la fracción sobrenadante. Las células recogidas se suspendieron en Tris-HCl 25 mM, a pH 8,8, y se incubaron a 60 °C durante 1 hora. Los residuos celulares se separaron del extracto térmico mediante centrifugación a 20.000 x g a 4 °C durante 30 minutos. Se añadió azida sódica (0,01 %) a la fracción sobrenadante extraída con calor, que se aclaró después mediante filtración microporosa.

- La resina de afinidad de anticuerpos monoclonales se preparó mediante conjugación del anticuerpo monoclonal (designado Bord 2-7) a sefarsa 4B activada con CNBr usando procedimientos estándar. Aproximadamente 30,35 mg de anticuerpo monoclonal se conjugaron con 1 gramo de resina de afinidad. La fracción de sobrenadante extraída con calor aclarada (anteriormente) y la resina de afinidad Bord 2-7 se combinaron a una proporción aproximada de 1 litro de extracto con 20 ml de resina.

- La unión del p68 nativo a la resina se facilitó incubando la mezcla a temperatura ambiente con agitación suave, durante la noche, seguido de fijación en la resina y aspiración de la fracción sobrenadante. Después, la resina se empaquetó en una columna de 2,6 cm de diámetro y la columna se lavó secuencialmente con PBS, pH 7,5 y tampón fosfato 10 mM, pH 8,0, a un caudal de 5 ml/min. Cuando la absorbancia a 280 nm alcanzó un nivel basal, el material unido se eluyó usando trietilamina 100 mM y las fracciones bajo el único pico grande de absorbancia de 280 nm se recogieron y analizaron para detectar la presencia de p68 mediante ELISA. Las fracciones que contenían p68 se combinaron y dializaron contra PBS para eliminar la trietilamina.

- 35 Se formuló en serie una vacuna experimental de modo que contuviera aproximadamente 100 microgramos de p68 purificado y 1 % de gel de hidróxido de aluminio. Se usó formalina (0,01 %) como conservante en un volumen final de dosis de la vacuna de 1 ml.

Inóculo de exposición

El material de exposición se preparó esencialmente como se ha descrito en los ejemplos anteriores.

Procedimiento del estudio

Veintiuno (21) cachorros seronegativos y con cultivos negativos fueron asignados aleatoriamente a uno de dos grupos de tratamiento. Once perros fueron asignados al grupo control no vacunado y diez perros al grupo vacunado. El día 0 se designó como el día de la primera vacunación. Un ml de la vacuna se administró por vía subcutánea el día 0 y se repitió 21 días después. La sangre se extrajo para el ELISA serológico de p68 antes de la primera y la segunda vacunación.

El día 35, catorce días después de la segunda vacunación se administró a todos los perros una exposición en aerosol de *B. bronchiseptica*, como se ha descrito anteriormente. Se monitorizó la tos de los animales durante 14 días después de la exposición como se ha descrito en los ejemplos previos.

Resultados

Resumen de las observaciones clínicas y las respuestas serológicas a p68 se presentan en la Tabla 40.

Tabla 40: Resumen de observaciones clínicas y respuestas serológicas

GRUPO	N	NÚMERO DE TOSSES EN DOS DÍAS CONSECUTIVOS	NORMAL TOTAL	TÍTULO (GMT) PREVAC.	TÍTULO (GMT) PREEXP.	TÍTULO (GMT) POSTEXP.
VACUNA	10	0	10/10	5,08	348,15	391,30
CONTROL	11	11	0/11	6,10	6,45	18,81

Discusión

En este estudio, 10 de 10 perros control tosieron en al menos dos días consecutivos. Un perro se considera clínicamente enfermo si tose durante dos días consecutivos. Con este criterio, el 100% de los perros control no vacunados estaba enfermo. En el grupo vacunado, un perro tosió el día 4 después de la exposición y un perro tosió los días 4 y 6 tras la exposición. Dos perros tosieron el día 14. Ninguno de los perros vacunados tosió durante dos días consecutivos. Por tanto, el 100 % de los perros en el grupo vacunado con p68 nativo se consideró que permanecían normales tras la exposición.

Conclusiones

Este ensayo demostró la capacidad de una vacuna de p68 nativo para proteger contra la enfermedad por *B. bronchiseptica*.

Ejemplo 6

Eficacia de las vacunas multivalentes caninas contra la exposición a *Leptospira bratislava*

El propósito de este estudio era demostrar la eficacia de las vacunas que contienen fracciones frente a *Leptospira serovariedades bratislava, canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae* y *pomona* contra la exposición a *L. bratislava* en perros.

MATERIALES

Vacunas: Las vacunas usadas fueron las siguientes:

1. Se usó una vacuna liofilizada que comprende los antígenos del virus del moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza y parvovirus (VANGUARD® PLUS 5). La vacuna contenía niveles de antígeno de liberación. Código del producto 13D1.22

2. Se usó una vacuna contra el coronavirus canino en una formulación de diluyente líquido (FIRSTDOSE® CV). La vacuna contenía niveles de antígeno de liberación. Código del producto 14P5.20

3. Se usó una vacuna liofilizada que comprende los antígenos del virus del moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza, parvovirus, bratislava, canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae y pomona (VANGUARD® PLUS 5). La vacuna contenía aproximadamente 600 nefos de cada serovariedad de *Leptospira*; y niveles de antígeno de liberación de las fracciones de virus vivo modificado (adenovirus canino, virus del moquillo, virus de la parainfluenza, parvovirus) Código del Producto 4637.2A

Animales del estudio: Se usaron cachorros de **sabueso** de aproximadamente 5-6 semanas de edad de cualquier

sexo. En el momento de la vacunación eran seronegativos ($< 1:8$) para las serovariedades de *Leptospira* bratislava, canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae y pomona. Se les permitió acceso a alimentos comerciales y al agua de la ciudad a demanda.

- 5 **Organismo de exposición:** A cada se le administró una dosis de aproximadamente 2 ml (dilución 10^{-1} de tejido de hígado de hámster infectado) de *Leptospira* Bratislava como inyección intraperitoneal.

Diseño del estudio

Nº de tto	Descripción de la vacuna*	Vía	Nº de perros	Día de la vac.	Día	Leptospira	Exposición**	Días de extracción de muestras de sangre
						Dosis	Dilución	
T1	Control	SC	10	0 y 21	49	2 ml	10^{-1}	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70
T2	Control	IM	10	0 y 21	49	2ml	10^{-1}	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70
T3	Leptospira	SC	10	0 y 21	49	2 ml	10^{-1}	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70
T4	Leptospira	IM	10	0 y 21	49	2 ml	10^{-1}	0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70

PROCEDIMIENTOS

- 10 **Fase de vacunación:** Los días de estudio 0 y 21 se administró a 40 perros en grupos de vacunados (10 animales/grupo) una inyección del control o las vacunas de prueba, tal como se indica más adelante:

T1: 1 ml de la vacuna control que contiene la vacuna del moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza, parvovirus reconstituida con diluyente de coronavirus canino y administrada por inyección subcutánea (SC). (Código del producto 13D1.22 reconstituido con el código del producto 14P5.20)

- 15 T2: 1 ml de la vacuna control que contiene la vacuna del moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza, parvovirus reconstituida con diluyente de coronavirus canino y administrada por inyección intramuscular (IM). (Código del producto 13D1.22 reconstituido con el código del producto 14P5.20)

- 20 T3: 1 ml de la vacuna de *Leptospira* que contiene la vacuna del moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza, parvovirus, bratislava, canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae y pomona reconstituida con diluyente de coronavirus canino y administrada por inyección SC. (Código del producto 46J7.2A; una combinación de los códigos del producto 4637.2A y 14P5.20)

T4: 1 ml de la vacuna de *Leptospira* que contiene la vacuna del moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parainfluenza, parvovirus, bratislava, canicola, grippotyphosa, icterohaemorrhagiae y pomona reconstituida con diluyente de coronavirus canino y administrada por inyección IM. (Código del producto 46J7.2A; una combinación de los códigos del producto 4637.2A y 14P5.20)

- 25 Las observaciones posvacunación de reacciones sistémicas no deseadas se realizaron aproximadamente 1 hora y 5 horas tras la vacunación.

Exposición a *Leptospira*: Los días del estudio 49, los animales de prueba fueron expuestos a una dosis de aproximadamente 2ml de *L. bratislava* mediante inyección intraperitoneal.

- 30 **Extracción de muestras de sangre:** Las muestras de suero se obtuvieron de animales disponibles los días de estudio 0, 21, 35, 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 y 70. De forma similar, las muestras de plasma se obtuvieron los días de estudio 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 y 70.

Serología bacteriana: Las muestras de suero obtenidas los días de estudio 0, 21, 35, 48, 58 y 70 se analizaron mediante una prueba de microaglutinación para los anticuerpos circulantes frente a *L. bratislava*.

- 35 **Espiroquetemia:** Las muestras de plasma obtenidas los días de estudio 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 y 70 se analizaron mediante microscopia de campo oscuro para detectar espiroquetas y cultivo para aislar *Leptospira*.

- 40 **Recuento sanguíneo completo/Panel de bioquímica en suero:** Las muestras de plasma obtenidas los días de estudio 48, 50, 52, 55, 58, 61, 64, 67 y 70 se analizaron para, entre otras cosas, contar el número de plaquetas y determinar la tasa de sedimentación. Las muestras de suero, obtenidas a esos mismos intervalos de tiempo, se analizaron para, entre otras cosas, determinar los niveles de amilasa, alanina, aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatinina. No se realizó un CBC y la tasa de sedimentación para 2 animales (nº QPH3, RVG3) el día del estudio 55, para un animal (Nº RBH3) el día del estudio 58, para 3 animales (Nº QPH3, RVG3) el día del estudio 61, ni para un animal (Nº OWG3) el día del estudio 70, porque las muestras de plasma obtenidas se

coagularon antes del análisis. El día del estudio 67 no se realizó una tasa de sedimentación para 2 animales (n° OUH3, SAG3) porque la cantidad de muestra de plasma no era suficiente para el análisis. Dichos resultados no tuvieron ningún impacto sobre estos parámetros del estudio.

Temperaturas corporales rectales: Las temperaturas corporales rectales se registraron los días del estudio 47-70. Tras la exposición (día del estudio 50), una temperatura corporal elevada de $\geq 39,2^{\circ}\text{C}$ se consideró indicativa de leptospirosis.

Cultivos de orina: Las muestras de orina obtenidas los días del estudio 48, 55 y 70 se cultivaron para *Leptospira* y se sometieron a análisis de orina. El día del estudio 48 no se realizó un análisis de orina para un animal (n° CBC3) porque la cantidad de orina disponible en el momento de la obtención no era suficiente para el análisis. El día del estudio 55 no se realizó un análisis de orina para 2 animales (n° OPH3, RXG3) por que la cantidad de orina disponible en el momento de la obtención no era suficiente para el análisis. El día del estudio 70 no se realizó una tasa de sedimentación para 10 animales (n° OYG3, PIG3, PUG3, QHG3, QQH3, QSG3, RDG3, RUG3, RVG3, RYG3) ya que las cantidades de orina disponibles en el momento de la obtención no eran suficientes para el análisis. Dichos resultados no tuvieron ningún impacto sobre este parámetro del estudio.

Necropsia y aislamiento de *Leptospira*: Los animales sacrificados durante o al final del periodo postexposición se sometieron a una necropsia. Los fluidos y tejidos corporales (es decir, hígado, riñón y orina) se recogieron y presentaron a BCL para aislar *Leptospira*. El día del estudio 55 no se completó el aislamiento de la bacteria para 2 animales (n° OPH3, RXG3) porque la cantidad de orina disponible en el momento de la obtención no era suficiente para el análisis. El día del estudio 70 no se completó el aislamiento de la bacteria para 4 animales (n° OYG3, PUG3, QSG3, RUG3) ya que las cantidades de orina disponibles en el momento de la obtención no eran suficientes para el análisis. Dichos resultados no tuvieron ningún impacto sobre este parámetro del estudio.

Observaciones del estado de salud: Se monitorizó a los animales a diario para determinar su estado de salud general.

Resumen y análisis de datos

Los datos se analizaron con un modelo mixto o un procedimiento categórico SAS/STAT Software Changes and Enhancements through Release 6.12, SAS Institute, Cary, North Carolina). Se usó un modelo mixto lineal general de medidas repetidas (los términos del modelo de efecto fijo son Tratamiento, día de estudio y tratamiento por día de estudio) para analizar la temperatura, los títulos de anticuerpo en suero, el recuento de plaquetas, la tasa de sedimentación, los niveles de amilasa, Alanina, aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST) y creatinina. Se realizaron contrastes de interés después de determinar un tratamiento significativo ($P \leq 0,05$) o tratamiento por día del efecto de interacción del estudio. Los títulos se transformaron logarítmicamente según lo adecuado para el análisis y, una vez transformados, las medias de mínimos cuadrados se retrotransformaron a las medias geométricas para la presentación. Las observaciones no analizadas (es decir, los resultados de la necropsia y las observaciones posvacunación) no se introdujeron en la base de datos para el resumen.

Para cada tratamiento se calcularon las distribuciones de frecuencia de los animales con recuentos de plaquetas <200 al menos una vez y los animales con temperaturas rectales superiores o iguales a $39,2^{\circ}\text{C}$. Los animales se clasificaron como normales o enfermos cada día postexposición durante el estudio. La presencia de cualquiera de los signos siguientes dieron como resultado una clasificación de enfermo: Conjuntivitis, depresión, inapetencia, temblores musculares, secreción nasal, pirexia ($\geq 39,2^{\circ}\text{C}$) u ojos acuosos.

Se usó un modelo mixto lineal general (el término del modelo de efecto mixto es tratamiento) para analizar el número de días postexposición que un animal se clasificó como enfermo. La variable binomial muerta o sacrificado se analizó con la prueba exacta de Fisher. La espiroquetemia y el aislamiento de la bacteria en la orina, el riñón y el hígado se analizaron usando la prueba exacta de Fisher para comparar los grupos de tratamiento.

En ausencia de una diferencia significativa entre las vías de administración y la vía por interacción del tratamiento ($P \geq 0,05$ bilateral), se usaron contrastes para comparar la media de los tratamientos T1 y T2 con la media de los tratamientos T3 y T4 ($P \leq 0,05$ unilateral). Si el análisis fue un análisis de medidas repetidas, la comparación se realizó en cada punto de tiempo en el que se recogieron datos. En caso contrario, los contrastes se usaron para comparar T1 con T3 y T2 con T4 ($P \leq 0,05$ unilateral). Estas comparaciones se realizaron en cada punto de tiempo si el análisis era de medidas repetidas.

La eficacia de la vacuna de *Leptospira* contra *L. bratislava* se demostró por una incidencia menor ($P \leq 0,05$; unilateral) de la enfermedad en los animales vacunados. Las siguientes variables avalan la eficacia de la vacuna de *Leptospira*: (1) El recuento medio de plaquetas fue significativamente mayor ($P \leq 0,05$; unilateral) para los vacunados; (2) la tasa de sedimentación media fue significativamente ($P \leq 0,05$; unilateral) menor para los vacunados; (3) La incidencia de la espiroquetemia fue significativamente ($P \leq 0,05$; unilateral) menor para los vacunados.

RESULTADOS

Signos clínicos postexposición: El número medio de días que los animales mostraron signos clínicos indicativos de leptospirosis (p. ej., conjuntivitis, depresión, diarrea, hematuria, ictericia, inapetencia, moribundo, temblores musculares, pirexia, vómitos) se presenta en la Tabla 1. Tras la exposición (días de estudio 50-70), el número medio de días que los controles T1 y T2 estaban enfermos fue de 4,3 y 3,3, respectivamente. Por el contrario, las medias para los vacunados de T3 y T4 eran 0,7 y 0,5, y dichos resultados mejoraron significativamente ($P < 0,05$) cuando se compararon con los controles T1-T2. El porcentaje de animales que presentan signos clínicos tras la exposición también se proporciona en la Tabla 1. El 75 % de los controles T1-T2 mostraron signos de leptospirosis, mientras que signos similares se observaron únicamente en el 30 % de los vacunados T3-T4. El número de animales infectados que requirieron eutanasia durante la fase de exposición del estudio también se presenta en la Tabla 1. Cinco animales (25 %) en los grupos control T1-T2 mostraron signos graves de leptospirosis y fueron sacrificados. Por el contrario, los vacunados T3-T4 permanecieron por lo demás sanos durante el mismo intervalo y dicha comparación (T1-T2 vs T3-T4) mejoró significativamente ($P < 0,05$) para los vacunados. En la Tabla 2 se presenta una representación de las temperaturas corporales medias tras la exposición. Durante los primeros 9 días tras la exposición (días de estudio 50-58), las temperaturas medias para los controles T1-T2 variaron de 37,8 a 39,4 °C. Durante el mismo intervalo, las temperaturas medias para los vacunados T3-T4 variaron de 38,2 a 38,7 °C. Es notable el hecho de que las temperaturas medias para los vacunados T3-T4 eran significativamente menores ($P < 0,05$) a 2, 3 y 5 días tras la exposición cuando se compararon con las temperaturas medias de T1-T2. La frecuencia de animales con al menos una temperatura $\geq 39,2$ °C también se presenta en la Tabla 2. Una temperatura corporal elevada de $\geq 39,2$ °C se consideró indicativa de infección por *Leptospira*. Durante el curso del período de observación postexposición, el 60-70% de los controles T1-T2 presentó una temperatura $\geq 39,2$ °C. Por el contrario, solo el 30 % de los vacunados T3-T4 presentó dicho signo clínico.

Espiroquetemia postexposición: La frecuencia de espiroquetemia se presenta en la Tabla 3. La presencia de espiroquetas en la sangre (detectadas mediante cultivo bacteriano) es un resultado clínico que muestra leptospirosis. Un día después de la exposición (día del estudio 50) se estableció espiroquetemia en el 90 % de los controles T1, el 60 % de los controles T2, el 60 % de los vacunados T3 y el 70 % de los vacunados T4. Cabía esperar un reaislamiento de la bacteria en la sangre a las 24 horas de las inyecciones intraperitoneales con independencia del estado de vacunación. Después se estableció espiroquetemia para los controles T1 del siguiente modo: 100 % el día 3 tras la exposición (día del estudio 52, 56 % el día 6 (día de estudio 55) y 33 % el día 9 (día de estudio 58). De forma similar se estableció espiroquetemia para los controles T2 del siguiente modo: 60% el día 3 tras la exposición, 50% el día 6 y 29% el día 9. Por el contrario, se estableció en los vacunados T3-T4 durante el mismo período postexposición no durante el resto del período postexposición (es decir, los días de estudio 50-70).

En general, el porcentaje de los animales positivos para espiroquetemia, incluido un día después de la exposición (días del estudio 50-70) fue 60%-100% para los controles T1-2 y 60%-70% de los vacunados T3-T4. En contraste, el porcentaje de los animales positivos excluido un día después de la exposición (días del estudio 52-70) fue 60%-100% para los controles T1-T2 y 0% de los vacunados T3-T4.

Reaislamiento de leptospira de fluidos y tejidos corporales tras la exposición: El reaislamiento de leptospira en muestras de sangre, orina, riñón e hígado se presenta en la tabla 4. En la sección anterior se proporciona un resumen de los resultados del reaislamiento de leptospira en sangre. A partir de 3 días después de la exposición (es decir, excluyendo el día 1 tras la exposición) se estableció espiroquetemia en el 60-100 % de los controles T1-T2 y no se estableció en los vacunados T3-T4 durante el mismo período. Es notable el hecho de que la comparación (T1-T2 vs T3-T4) mejoró significativamente ($P < 0,05$) para los vacunados.

En la necropsia se obtuvieron muestras de riñón. Se reaisló leptospira del 50 % de las muestras de riñón obtenidas de los controles T1 y T2. No se reaisló de muestras derivadas de los vacunados T3-T4. Dicha comparación (T1-T2 vs T3-T4) mejoró significativamente ($P < 0,05$) para los vacunados.

En la necropsia se obtuvieron muestras de hígado. Se reaisló leptospira del 10% y el 20 % de las muestras de hígado obtenidas de los controles T1 y T2, respectivamente. No se reaisló de muestras derivadas de los vacunados T3-T4. Dicha comparación (T1-T2 vs T3-T4) mejoró significativamente ($P < 0,05$) para los vacunados.

Las muestras de orina se obtuvieron a 2 intervalos tras la exposición en la necropsia. Se reaisló leptospira de 2 controles T1 a los 6 días de la exposición (día del estudio 55). No se reaisló *Leptospira* de ninguna muestra de los controles T2 ni de los vacunados T3-T4.

Recuentos de plaquetas tras la exposición: Los recuentos medios de plaquetas se presentan en la Tabla 5. Una disminución del número de plaquetas en sangre (trombocitopenia) es un resultado clínico indicativo de leptospirosis. Las concentraciones medias para los controles T1-T2 variaron entre 61 y 937. Durante el mismo intervalo, los recuentos medios para los vacunados T3-T4 variaron entre 400 y 566. Es notable el hecho de que los recuentos de plaquetas para los vacunados T3-T4 mejoraron significativamente ($P < 0,05$) a los 3, 6 y 9 días de la exposición en comparación con los controles T1-T2.

La frecuencia de animales con al menos un recuento de plaquetas < 200 también se presenta en la Tabla 5. Durante

el curso del periodo postexposición, se determinó que el 90 % de los controles T1 y el 60 % de los controles T2 eran trombocitopénico (recuento de plaquetas < 200). Por el contrario, sólo el 10 % de los vacunados T3 y ninguno de los vacunados T4 era trombocitopénico tras la infección.

Tasas de sedimentación tras la exposición: Las tasas de sedimentación medias se presentan en la Tabla 6. Un incremento de la tasa de sedimentación es un resultado clínico indicativo de leptospirosis.

Las tasas medias para los controles T1-T2 variaron entre 2,4 y 16,0. Durante el mismo intervalo, las tasas medias para los vacunados T3-T4 variaron entre 1,5 y 6,3. Es notable el hecho de que las tasas para los vacunados T3-T4 eran significativamente menores ($P<0,05$) a los 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 días después de la exposición cuando se compararon con las de los controles T1-T2.

Concentraciones de ALT tras la exposición: Las concentraciones medias de alanina aminotransferasa (ALT) se presentan en la Tabla 7. Un incremento de ALT es un resultado clínico indicativo de la infección bacteriana (es decir, a medida que la función hepática se deteriora, los niveles de ALT aumentan). Las concentraciones medias para los controles T1-T2 variaron entre 22 y 79. Durante el mismo intervalo, las concentraciones medias para los vacunados T3-T4 variaron entre 21 y 61. Es notable el hecho de que las concentraciones para los vacunados T3-T4 fueron significativamente ($P<0,05$) menores a los 3, 6, 9 y 12 días de la exposición en comparación con los controles T1-T2.

Concentraciones de creatinina tras la exposición: Las concentraciones medias de creatinina se presentan en la Tabla 8. Un incremento de las concentraciones de creatinina es un resultado clínico indicativo de la infección bacteriana (es decir, a medida que la función renal se deteriora por la leptospirosis, los niveles de creatinina aumentan). Las concentraciones medias para los controles T1 (es decir, administración SC) variaron entre 0,30 y 99. Durante el mismo intervalo, las concentraciones medias para los vacunados T3 (es decir, administración SC) variaron entre 0,26 y 0,40. Es notable el hecho de que las concentraciones para los vacunados T3 eran significativamente menores ($P<0,05$) a los 1, 6, 9, 12, 15, 18 y 21 días después de la exposición cuando se compararon con las de los controles T1. Las concentraciones medias para los controles T2 (es decir, administración IM) variaron entre 0,30 y 1,31. Durante el mismo intervalo, las concentraciones medias para los vacunados T4 (es decir, administración IM) variaron entre 0,32 y 0,46. No se observaron diferencias significativas entre los valores de T2 y T4 tras la exposición.

Amilasa, AST y análisis de orina tras la exposición: No se observaron diferencias significativas en las concentraciones medias para los vacunados T3-T4 cuando se compararon con los controles T1-T2. No obstante, en general, las concentraciones postexposición aumentaron de forma más espectacular para los controles T1-T2. No se observaron cambios grandes postexposición en los niveles de AST (aspartato aminotransaminasa) y los resultados del análisis de orina para los animales de prueba T1-T4. Los resultados para estos 3 parámetros no se tabulan de otro modo en el presente documento.

Títulos de anticuerpos en suero: Los títulos medios en suero del anticuerpo frente a *L. bratislava* se presentan en la Tabla 4. Durante la fase de vacunación de la investigación (días del estudio 0-48), los títulos medios para los controles T1-T2 eran aproximadamente 2 (es decir, seronegativo). De forma correspondiente, las medias para los vacunados T3-T4 variaron entre 2 (prevacunación) y 1181 (posvacunación). Es notable el hecho de que los títulos medios para los vacunados T3-T4 eran significativamente mayores ($P<0,05$) a los 21, 35 y 48 días después de la exposición cuando se compararon con los títulos medios T1-T2.

Durante la fase de exposición de la investigación (días de estudio 58 y 70), los títulos medios para los controles T1-T2 variaron entre 2135 y 41160. De forma correspondiente, los títulos medios para los vacunados T3 y T4 variaron entre 727 y 10891, y fueron significativamente ($P<0,05$) menores el día del estudio 58 (es decir, 9 días tras la exposición) y 70 días tras la vacunación (es decir, día 21 PC) en comparación con los controles T1-T2. Como resultado, los controles mostraron una espectacular respuesta primaria a *L. bratislava* postexposición (es decir, infección establecida), mientras que la respuesta para los vacunados T3-T4 fue menos sólida (es decir, la típica respuesta anamnésica).

Reacciones sistémicas posvacunación: No se observaron reacciones sistémicas posvacunación en los animales de prueba T1-T4 cuando se evaluaron 1 y 5 horas después de las vacunaciones primaria y de refuerzo. Dicho resultado no está tabulado en el presente documento.

CONCLUSIÓN

La eficacia de una vacuna multivalente de *Leptospira* administrada mediante inyección SC o IM contra *L. bratislava* se demostró tras la exposición mediante, entre otros: (1) una incidencia significativamente menor de enfermedad asociada con *Leptospira*, (2) una incidencia significativamente menor de espiroquetemia, (3) recuentos de plaquetas significativamente mayores y (4) tasas de sedimentación medias significativamente menores, en comparación con los controles.

Tabla 41: Resumen de signos clínicos tras la exposición con *L. bratislava* para perros inmunizados con un control o con una vacuna multivalente de *Leptospira*

Grupos de tratamiento (vacunado)		Nº de animales expuestos	Número de días que muestran signos clínicos de leptospirosis postexposición			Porcentaje de animales con signos clínicos postexposición†	Porcentaje de animales infectados que requieren eutanasia†
			Media†	Mínimo	Máximo		
T1	CONTROL (SC)	10	4,3	0	9	90% N = 9/10	10% N=1/10
T2	CONTROL (IM)	10	3,3	0	10	60% N=6/10	40% N=4/10
T3	VACUNA LEPTO (SC)	10	0,7	0	4	30% N=3/10	0% N=0/10
T4	VACUNA LEPTO (IM)	10	0,5	0	3	30% N=3/10	0% N=0/10
†porcentaje o tratamiento, medias de mínimos cuadrados. La media de los controles (T1-T2) es significativamente diferentes ($P \leq 0,05$) de la media de los vacunados (T3-T4).							

Tabla 42: Temperaturas corporales medias tras la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o con una vacuna multivalente de Leptospira

Grupo de tratamiento (vacunados)		Temperaturas medias por día de estudio** (día tras la exposición)										Frecuencia (%) con una temperatura $\geq 39,2$ °C
		49 (0)	50 (1)	51 (2)†	52 (3)†	53 (4)	54 (5)†	55 (6)	56 (7)	57 (8)	58 (9)	
T1	CONTROL (SC)	38,1 N= 10	38,6 N= 10	39,4 N= 10	38,9 N= 10	38,5 N= 10	38,8 N= 9	38,6 N= 9	38,2 N= 9	38,2 N= 9	38,3 N= 9	70 N= 7/10
T2	CONTROL (IM)	38,3 N= 10	38,5 N= 10	39,4 N= 10	38,9 N= 10	38,7 N= 10	38,6 N= 8	38,3 N= 8	37,8 N= 8	38,2 N= 7	38,1 N= 7	60 N= 6/10
T3	VACUNA LEPTO. (SC)	38,2 N= 10	38,4 N= 10	38,5 N= 10	38,3 N= 10	38,7 N= 10	38,5 N= 10	38,5 N= 10	38,2 N= 10	38,5 N= 10	38,4 N= 10	30 N= 3/10
T4	VACUNA LEPTO. (IM)	38,2 N= 10	38,5 N= 10	38,5 N= 10	38,3 N= 10	38,5 N= 10	38,5 N= 10	38,3 N= 10	38,3 N= 10	38,4 N= 10	38,6 N= 10	30 N= 3/10
**Medias de mínimos cuadrados del tratamiento. N= número de animales o número con temperaturas postexposición $\geq 39,2$ °C/número de animales. †La media de los controles (T1-T2) es significativamente diferente ($P \leq 0,05$) de la media de los vacunados (T3-T4).												

Tabla 43: Frecuencia de espiroquetemia tras la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o con una vacuna multivalente de Leptospira

Grupo de tratamiento (vacunado)		Frecuencia (%) de espiroquetemia por día de estudio** (día postexposición)									
		48 (-1)	50 (1)	52 (3)	55 (6)	58 (9)	61 (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)	
T1	CONTROL (SC)	0 N=0/10	90 N=9/10	100 N=10/10	56 N=5/9	33 N=3/9	0 N=0/9	0 N=0/9	0 N=0/9	0 N=0/9	
T2	CONTROL (IM)	0 N=0/10	60 N=6/10	60 N=6/10	50 N=4/8	29 N=2/7	0 N=0/6	0 N=0/6	0 N=0/6	0 N=0/6	
T3	VACUNA LEPTO. (SC)	0 N=0/10	60 N=6/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	
T4	VACUNA LEPTO. (IM)	0 N=0/10	70 N=7/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	

**N = número positivo para espiroquetemia/número de animales.

**N = número positivo para espiroquetemia/número de animales.

Tabla 44: Frecuencia de reaislamiento de Leptospira de fluidos y tejidos corporales tras la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o con una vacuna multivalente de Leptospira

Grupos de tratamiento (vacunado)		Frecuencia (%) de reaislamiento de leptospira de fluidos y tejidos corporales**				
		Sangre [†]		Orina	Riñón ^{††}	Hígado ^{††}
		Incluido día +1 postexposición	Excluido día +1 postexposición ^{††}			
T1	CONTROL (SC)	100 N=10/10	100 N=10/10	22 N=2/9	50 N=5/10	10 N=1/10
T2	CONTROL (IM)	60 N=6/10	60 N=6/10	0 N=0/7	50 N=5/10	20 N=2/10
T3	VACUNA LEPTO. (SC)	60 N=6/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10
T4	VACUNA LEPTO. (IM)	70 N=7/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10	0 N=0/10

**N = número positivo para espiroquetemia/número de animales.
[†]Bacteria prevista en la circulación sanguínea a las 24 horas de la inyección intraperitoneal con independencia del estado de vacunación. Por tanto, los datos de reaislamiento también se resumen, excluyendo los resultados obtenidos 1 día después de la exposición (día del estudio 50).
^{††}La media de los controles (T1-T2) es significativamente diferente ($P \leq 0,05$) de la media de los vacunados (T3-T4).

Tabla 45: Recuentos medios de plaquetas tras la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o con una vacuna multivalente de Leptospira

Grupo de tratamiento (vacunado)		Recuentos medios de plaquetas por día de estudio** (día postexposición)									Frecuencia (%) con un recuento de plaquetas < 200
		48 (-1)	50 (1)	52 (3) [†]	55 (6) [†]	58 (9) [†]	61 (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)	
T1	CONTROL (SC)	534 N=10	426 N=10	61 N=10	128 N=8	499 N=8	937 N=9	724 N=9	586 N=9	490 N=8	90 N=9/10
T2	CONTROL (IM)	549 N=10	451 N=10	174 N=10	204 N=8	480 N=7	738 N=5	735 N=6	604 N=6	498 N=6	60 N=6/10
T3	VACUNA LEPTO. (SC)	557 N=10	450 N=10	463 N=10	560 N=10	538 N=10	506 N=9	490 N=10	458 N=10	465 N=10	10 N=1/10
T4	VACUNA LEPTO. (IM)	521 N=10	442 N=10	400 N=10	552 N=9	566 N=10	483 N=9	478 N=10	472 N=10	472 N=10	0 N=0/10

**Medias de mínimos cuadrados del tratamiento. N= número de animales o número con recuentos de plaquetas postexposición < 200 /número de animales.
[†]La media de los controles (T1-T2) es significativamente diferente ($P \leq 0,05$) de la media de los vacunados (T3-T4).

Tabla 46: Tasas de sedimentación medias tras la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o con una vacuna multivalente de Leptospira

Grupo de tratamiento (vacunado)		Tasas de sedimentación medias por día de estudio** (día postexposición)								
		48 (-1)	50 (1)	52 (3) [†]	55 (6) [†]	58 (9) [†]	61 (12) [†]	64 (15) [†]	67 (18) [†]	70 (21) [†]
T1	CONTRO L (SC)	1,3 N=10	6,7 N=10	10,4 N=10	9,0 N=8	6,8 N=8	4,5 N=9	4,6 N=9	3,0 N=9	2,4 N=8
T2	CONTRO L (IM)	1,2 N=10	5,7 N=10	10,2 N=10	9,7 N=8	16,0 N=7	5,9 N=5	5,1 N=6	3,6 N=6	3,3 N=6
T3	VACUNA LEPTO. (SC)	1,1 N=10	5,3 N=10	2,9 N=10	3,0 N=10	3,3 N=10	2,3 N=9	2,1 N=10	1,9 N=9	1,5 N=10
T4	VACUNA LEPTO (IM)	1,3 N=9	6,3 N=10	3,8 N=10	4,3 N=9	3,9 N=10	2 N=9	2,4 N=10	2,5 N=9	2,1 N=10

**Medias de mínimos cuadrados del tratamiento. N=número de animales.

[†]La media de los controles (T1-T2) es significativamente diferente ($P \leq 0,05$) de la media de los vacunados (T3-T4).

5

Tabla 47: Concentraciones medias de ALT (alanina aminotransferasa) tras la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o con una vacuna multivalente de Leptospira

Grupo de tratamiento (vacunado)		Concentraciones de ALT por día de estudio** (día postexposición)								
		48 (-1)	50 (1)	52 [†] (3)	55 [†] (6)	58 [†] (9)	61 [†] (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)
T1	CONTROL (SC)	33 N=10	66 N=10	79 N=10	32 N=9	34 N=9	26 N=9	24 N=9	22 N=9	24 N=9
T2	CONTROL (IM)	35 N=10	60 N=10	63 N=10	30 N=8	32 N=7	34 N=6	26 N=6	24 N=6	24 N=6
T3	VACUNA LEPTO. (SC)	30 N=10	57 N=10	27 N=10	22 N=10	23 N=10	22 N=10	23 N=10	21 N=10	22 N=10
T4	VACUNA LEPTO (IM)	32 N=10	61 N=10	30 N=10	22 N=10	25 N=10	26 N=10	26 N=10	24 N=10	25 N=10

**Medias de mínimos cuadrados del tratamiento. N=número de animales.

[†]La media de los controles (T1-T2) es significativamente diferente ($P \leq 0,05$) de la media de los vacunados (T3-T4).

Tabla 48: Concentraciones medias de creatinina tras la exposición con L. bratislava para perros inmunizados con un control o con una vacuna multivalente de Leptospira

Grupo de tratamiento (vacunado)		Concentraciones medias de creatinina por día de estudio** (día postexposición)								
		48 (-1)	50 (1)	52 (3)	55 (6)	58 (9)	61 (12)	64 (15)	67 (18)	70 (21)
T1	CONTROL (SC)	0,32 ^a N=10	0,33 ^a N=10	0,30 ^a N=10	0,80 ^a N=9	0,99 ^a N=9	0,70 ^a N=9	0,63 ^a N=9	0,52 ^a N=9	0,39 ^a N=9
T3	VACUNA LEPTO. (SC)	0,31 ^a N=10	0,26 ^b N=10	0,32 ^a N=10	0,37 ^b N=10	0,39 ^b N=10	0,33 ^b N=10	0,40 ^b N=10	0,36 ^b N=10	0,27 ^b N=10
T2	CONTROL (IM)	0,31 ^a N=10	0,33 ^a N=10	0,30 ^a N=10	1,318 N=8	1,08 ^a N=7	0,51 ^a N=6	0,51 ^a N=6	0,42 ^a N=6	0,30 ^a N=6
T4	VACUNA LEPTO (IM)	0,33 ^a N=10	0,32 ^a N=10	0,33 ^a N=10	0,41 ^a N=10	0,43 ^a N=10	0,36 ^a N=10	0,46 ^a N=10	0,39 ^a N=10	0,32 ^a N=10
**Medias de mínimos cuadrados del tratamiento. N=número de animales. ^{a,b} Los valores en columnas (para T1 vs T3 y T2 vs T4) con superíndices diferentes son significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).										

5

Tabla 49: Títulos medios de anticuerpo frente a L. bratislava en suero para perros inmunizados con un control o con una vacuna multivalente de Leptospira

Grupo de tratamiento (vacunado)		Títulos medios de anticuerpos frente a L. bratislava ** (día de estudio postexposición)					
		0	21†	35†	48†	58†	70†
T1	CONTROL (SC)	2 N=10	3 N=10	2 N=10	2 N=10	41160 N=9	4770 N=9
T2	CONTROL (IM)	2 N=10	2 N=10	2 N=10	3 N=10	22571 N=7	2135 N=6
T3	VACUNA LEPTO. (SC)	2 N=10	56 N=10	1032 N=10	159 N=10	10891 N=10	1106 N=10
T4	VACUNA LEPTO (IM)	2 N=10	97 N=10	1181 N=10	257 N=10	8819 N=10	727 N=10
**Medias geométricas del tratamiento. N=número de animales. †La media de los controles (T1-T2) es significativamente diferente ($P \leq 0,05$) de la media de los vacunados (T3-T4)							

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Frantz, Joseph C.

Tucker, cassius M.

Newby, Thomas J.

5

<120> VACUNAS CANINAS CONTRA BORDETELLA BRONCHISEPTICA

<130> PC32220A

10

<140> 60/443,418 <141> 2003-01-29

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.2

15

<210> 1

<211> 602

<212> PRT

<213> Bordetella bronchiseptica

20

<400> 1

ES 2 370 750 T3

Asp Pro Asn Thr Val Ser Ile Ile Lys Ala Gly Glu Arg Gln His Gly
 1 5 10 15
 Ile His Ile Lys Gln Ser Asp Gly Ala Gly Val Arg Thr Ala Thr Gly
 20 25 30
 Thr Thr Ile Lys Val Ser Gly Arg Gln Ala Gln Gly Val Leu Leu Glu
 35 40 45
 Asn Pro Ala Ala Glu Leu Arg Phe Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser Ser
 50 55 60
 Gly Gln Leu Phe Asp Glu Gly Val Arg Arg Phe Leu Gly Thr Val Thr
 65 70 75 80
 Val Lys Ala Gly Lys Leu Val Ala Asp His Ala Thr Leu Ala Asn Val
 85 90 95
 Ser Asp Thr Arg Asp Asp Asp Gly Ile Ala Leu Tyr Val Ala Gly Glu
 100 105 110
 Gln Ala Gln Ala Ser Ile Ala Asp Ser Thr Leu Gln Gly Ala Gly Gly
 115 120 125
 Val Arg Val Glu Arg Gly Ala Asn Val Thr Val Gln Arg Ser Thr Ile
 130 135 140
 Val Asp Gly Gly Leu His Ile Gly Thr Leu Gln Pro Leu Gln Pro Glu
 145 150 155 160
 Asp Leu Pro Pro Ser Arg Val Val Leu Gly Asp Thr Ser Val Thr Ala
 165 170 175
 Val Pro Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Val Ser Val Phe Gly Ala Asn

ES 2 370 750 T3

180										185										190									
Glu	Leu	Thr	Val	Asp	Gly	Gly	His	Ile	Thr	Gly	Gly	Arg	Ala	Ala	Gly														
		195					200					205																	
Val	Ala	Ala	Met	Asp	Gly	Ala	Ile	Val	His	Leu	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile														
	210					215					220																		
Arg	Arg	Gly	Asp	Ala	Pro	Ala	Gly	Gly	Ala	Val	Pro	Gly	Gly	Ala	Val														
225					230					235					240														
Pro	Gly	Gly	Phe	Gly	Pro	Leu	Leu	Asp	Gly	Trp	Tyr	Gly	Val	Asp	Val														
				245					250					255															
Ser	Asp	Ser	Thr	Val	Asp	Leu	Ala	Gln	Ser	Ile	Val	Glu	Ala	Pro	Gln														
			260					265					270																
Leu	Gly	Ala	Ala	Ile	Arg	Ala	Gly	Arg	Gly	Ala	Arg	Val	Thr	Val	Ser														
		275					280					285																	
Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Ala	Pro	His	Gly	Asn	Val	Ile	Glu	Thr	Gly	Gly														
	290					295					300																		
Gly	Ala	Arg	Arg	Phe	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Pro	Leu	Ser	Ile	Thr	Leu														
305					310					315					320														
Arg	Ala	Gly	Ala	Arg	Ala	Gln	Gly	Arg	Ala	Leu	Leu	Tyr	Arg	Val	Leu														
				325					330					335															
Pro	Glu	Pro	Val	Lys	Leu	Thr	Leu	Ala	Gly	Gly	Ala	Gln	Gly	Gln	Gly														
			340					345					350																
Asp	Ile	Val	Ala	Thr	Glu	Leu	Pro	Pro	Ile	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Gly														
		355					360					365																	
Pro	Leu	Asp	Val	Ala	Leu	Ala	Ser	Gln	Ala	Arg	Trp	Thr	Gly	Ala	Thr														
	370					375					380																		
Arg	Ala	Val	Asp	Ser	Leu	Ser	Ile	Asp	Asn	Ala	Thr	Trp	Val	Met	Thr														
385					390					395				400															
Asp	Asn	Ser	Asn	Val	Gly	Ala	Leu	Arg	Leu	Ala	Ser	Asp	Gly	Ser	Val														
				405					410					415															
Asp	Phe	Gln	Gln	Pro	Ala	Glu	Ala	Gly	Arg	Phe	Lys	Val	Leu	Met	Val														
			420					425					430																
Asp	Thr	Leu	Ala	Gly	Ser	Gly	Leu	Phe	Arg	Met	Asn	Val	Phe	Ala	Asp														
		435					440					445																	
Leu	Gly	Leu	Ser	Asp	Lys	Leu	Val	Val	Met	Arg	Asp	Ala	Ser	Gly	Gln														
	450					455					460																		

ES 2 370 750 T3

His Arg Leu Trp Val Arg Asn Ser Gly Ser Glu Pro Ala Ser Ala Asn
465 470 475 480

Thr Met Leu Leu Val Gln Thr Pro Arg Gly Ser Ala Ala Thr Phe Thr
485 490 495

Leu Ala Asn Lys Asp Gly Lys Val Asp Ile Gly Thr Tyr Arg Tyr Arg
500 505 510

Leu Ala Ala Asn Gly Asn Gly Gln Trp Ser Leu Val Gly Ala Lys Ala
515 520 525

Pro Pro Ala Pro Lys Pro Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gln Pro Gly Pro
530 535 540

Gln Pro Gly Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro
545 550 555 560

Gln Arg Gln Pro Glu Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ala Gly Arg Glu
565 570 575

Leu Ser Ala Ala Ala Asn Ala Ala Val Asn Thr Gly Gly Val Gly Leu
580 585 590

Ala Ser Thr Leu Trp Tyr Ala Glu Ser Asn
595 600

<210> 2

<211> 1806

<212> ADN

5 <213> Bordetella bronchiseptica

<400> 2

ES 2 370 750 T3

gatccaaaca ctgtgtcaat catcaaggcc ggcgagcgcc agcacggcat ccacatcaag	60
caaagcgatg gcgccggcgt acggaccgcc accggaacga ccatcaagggt aagcggctcgt	120
caggcccagg gcgtcctgct ggaaaatccc gcggccgagc tgcggttcca gaacggcagc	180
gtcacgtctt cgggacagct gttcgacgaa ggcgtccggc gctttctggg caccgtcacc	240
gtcaaggccg gcaagctggt cgccgatcac gccacgctgg ccaacgtcag cgacaccgg	300
gacgacgacg gcatcgcgct ctatgtggcc ggcgagcagg cccaggccag catcgccgac	360
agcaccctgc agggcgcggg cggcgtgagg gtcgagcgcg gcgccaatgt cacgggtccaa	420
cgcagcacca tcgttgacgg gggcttgcat atcggcacc tgcagccgct gcagccggaa	480
gaccttcgc ccagccgggt ggtgctgggc gacaccagcg tgaccgccgt gcccgccagc	540
ggcgcgccc cggcgggtgtc tgtattcggg gccaatgagc ttacggttga tggcgggcac	600
atcaccgggg ggcgggcagc ggggggtggcg gccatggacg gggcgatcgt gcatctgcag	660
cgcgcgacga tacggcgggg ggacgcgcct gccggcggtg cggttccagg cggtcgggtt	720
cccggcggtc tcggccccct ccttgacggc tggtatggcg tggatgtatc ggactccacc	780
gtggacctcg ctcagtcgat cgtcgaggcg ccgcagctgg gcgccgcgat ccgggcgggc	840
cgcggcgcca gggtagcggg gtcgggcggc agcttgctcc caccgcacgg caatgtcatc	900
gagaccggcg gcgggtgcgc tcgcttcccg cctccggcct cggccctgtc gatcaccttg	960
cgggcgggcg cacgggcgca ggggagggcg ctgctgtacc gggtcctgcc ggagcccggt	1020
aagctgacgc tggcgggcgg cggccagggg cagggcgaca tcgtcgcgac ggagctgcct	1080
cccatctcag gcgcgtcgag cgggcccgtc gacgtggcgc tggccagcca ggcccgatgg	1140
acgggcgcta cccgcgcggg cgactcgctg tccatcgaca acgccacctg ggtcatgacg	1200
gacaactcga acgtcggcgc gctgcggctg gccagcgacg gcagcgtcga tttccagcag	1260
ccggccgaag ctgggcgggt caaggctctg atggctgata cgctggcggg ttcggggctg	1320
ttccgcatga atgtcttcgc ggacctgggg ctgagcgaca agctggctgt catgcgggac	1380
gccagcggcc agcacaggct gtgggtccgc aacagcggca gcgagccggc cagcgccaac	1440
accatgctgc tggtagcagac gccacgaggc agcgcgggca cctttaccct tgccaacaag	1500
gacggcaagg tcgatatcgg tacctaccgc tatcgattgg ccgccaacgg caatgggcag	1560
tggagcctgg tgggcgcgaa ggcgccgccg gcgccaagc ccgcgccgca gcccggtccc	1620
cagcccgtc cccagcccgg tccccagccg ccgcagccgc cgagccgcc gcagccgcca	1680
cagaggcagc cggaagcgcc ggcgccgcaa ccgcccggcg gcagggagtt gtccgccgcc	1740
gccaacgcgg cggtaacac ggggtggggtg ggcctggcca gcacgctctg gtacgccgaa	1800
agcaat	1806

<210> 3

5

<211> 599

<212> PRT

<213> Bordetella bronchiseptica

ES 2 370 750 T3

<400> 3

```

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Ile Ile Lys Ala Gly Glu Arg Gln His Gly
1      5      10
Ile His Ile Lys Gln Ser Asp Gly Ala Gly Val Arg Thr Ala Thr Gly
20      25      30
Thr Thr Ile Lys Val Ser Gly Arg Gln Ala Gln Gly Val Leu Leu Glu
35      40      45
Asn Pro Ala Ala Glu Leu Arg Phe Gln Asn Gly Ser Val Thr Ser Ser
50      55      60
Gly Gln Leu Phe Asp Glu Gly Val Arg Arg Phe Leu Gly Thr Val Thr
65      70      75      80
Val Lys Ala Gly Lys Leu Val Ala Asp His Ala Thr Leu Ala Asn Val
85      90      95

```

Ser Asp Thr Arg Asp Asp Asp Gly Ile Ala Leu Tyr Val Ala Gly Glu
 100 105 110
 Gln Ala Gln Ala Ser Ile Ala Asp Ser Thr Leu Gln Gly Ala Gly Gly
 115 120 125
 Val Arg Val Glu Arg Gly Ala Asn Val Thr Val Gln Arg Ser Thr Ile
 130 135 140
 Val Asp Gly Gly Leu His Ile Gly Thr Leu Gln Pro Leu Gln Pro Glu
 145 150 155 160
 Asp Leu Pro Pro Ser Arg Val Val Leu Gly Asp Thr Ser Val Thr Ala
 165 170 175
 Val Pro Ala Ser Gly Ala Pro Ala Ala Val Ser Val Phe Gly Ala Asn
 180 185 190
 Glu Leu Thr Val Asp Gly Gly His Ile Thr Gly Gly Arg Ala Ala Gly
 195 200 205
 Val Ala Ala Met Asp Gly Ala Ile Val His Leu Gln Arg Ala Thr Ile
 210 215 220
 Arg Arg Gly Asp Ala Pro Ala Gly Gly Ala Val Pro Gly Gly Ala Val
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Phe Gly Pro Leu Leu Asp Gly Trp Tyr Gly Val Asp Val
 245 250 255
 Ser Asp Ser Thr Val Asp Leu Ala Gln Ser Ile Val Glu Ala Pro Gln
 260 265 270
 Leu Gly Ala Ala Ile Arg Ala Gly Arg Gly Ala Arg Val Thr Val Ser
 275 280 285
 Gly Gly Ser Leu Ser Ala Pro His Gly Asn Val Ile Glu Thr Gly Gly
 290 295 300
 Gly Ala Arg Arg Phe Pro Pro Pro Ala Ser Pro Leu Ser Ile Thr Leu
 305 310 315 320
 Gln Ala Gly Ala Arg Ala Gln Gly Arg Ala Leu Leu Tyr Arg Val Leu
 325 330 335
 Pro Glu Pro Val Lys Leu Thr Leu Ala Gly Gly Ala Gln Gly Gln Gly
 340 345 350
 Asp Ile Val Ala Thr Glu Leu Pro Pro Ile Pro Gly Ala Ser Ser Gly
 355 360 365
 Pro Leu Asp Val Ala Leu Ala Ser Gln Ala Arg Trp Thr Gly Ala Thr

ES 2 370 750 T3

370	375	380
Arg 385	Ala Val Asp Ser Leu 390	Ser Ile Asp Asn Ala Thr Trp Val Met Thr 395 400
Asp Asn Ser Asn Val 405	Gly Ala Leu Arg Leu 410	Ala Ser Asp Gly Ser Val 415
Asp Phe Gln Gln 420	Pro Ala Glu Ala Gly 425	Arg Phe Lys Cys Leu Met Val 430
Asp Thr Leu 435	Ala Gly Ser Gly Leu 440	Phe Arg Met Asn Val Ala Phe Ala 445
Asp Leu Gly Leu Ser Asp Lys 450 455	Leu Val Val Met Arg Asp Ala Ser Gly 460	
Gln His Arg Leu Leu Val 465 470	Arg Asn Ser Gly Ser Glu Pro Ala Ser Gly 475 480	
Asn Thr Met Leu Leu Val 485	Gln Thr Pro Arg Gly Ser Ala Ala Thr Phe 490 495	
Thr Leu Ala Asn 500	Lys Asp Gly Lys Val Asp Ile Gly Thr Tyr Arg Tyr 505 510	
Arg Leu Ala 515	Ala Asn Gly Asn Gly Gln Trp Ser Leu Val Gly Ala Lys 520 525	
Ala Pro Pro Ala Pro Lys Pro 530 535	Ala Pro Gln Pro Gly Pro Gln Pro Gly 540	
Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Pro Pro Gln Arg Gln 545 550 555 560		
Pro Glu Ala Pro Ala Pro Gln Pro Pro Ala Gly Arg Glu Leu Ser Ala 565 570 575		
Ala Ala Asn Ala Ala Val Asn Thr Gly Gly Val Gly Leu Ala Ser Thr 580 585 590		
Leu Trp Tyr Ala Glu Ser Asn 595		

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna para usar en la inmunización de perros contra la infección causada por *Leptospira bratislava*, que comprende una preparación celular de *Leptospira* de *Leptospira bratislava* y un vehículo.
- 5 2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que dicha preparación celular de *Leptospira* comprende además una preparación celular de al menos uno de *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae* o *Leptospira pomona*, en la que la cantidad de cada cepa de *Leptospira* en la composición de vacuna está en el intervalo de aproximadamente 100-3500 unidades nefelométricas por dosis de vacuna.
- 10 3. Una vacuna de composición para usar en la inmunización de perros contra patógenos caninos, que comprende la composición de la reivindicación 2 y que además comprende una cepa atenuada del virus del moquillo canino (CD), una cepa atenuada del adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), una cepa atenuada del virus de la parainfluenza canina (CPI), una cepa atenuada del parvovirus canino (CPV) y un vehículo, en la que la cantidad de cada cepa atenuada de virus en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 TCID₅₀ por dosis.
- 15 4. La vacuna de combinación de la reivindicación 3, que comprende además una preparación de células parciales o enteras inactivadas de una cepa del coronavirus canino (CCV).
- 20 5. Una vacuna de composición para su uso en la inmunización de perros contra patógenos caninos, que comprende una preparación celular de *Leptospira* de *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, y *Leptospira pomona* y que además comprende una cepa atenuada del virus del moquillo canino (CD), una cepa atenuada del adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), una cepa atenuada del virus de la parainfluenza canina (CPI), una cepa atenuada del parvovirus canino (CPV) y un vehículo.
- 25 6. La vacuna de combinación de la reivindicación 5, que comprende además una preparación de células parciales o enteras inactivadas de una cepa del coronavirus canino (CCV).
7. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1, 5 y 6, en la que la cantidad de cada de *Leptospira* está en el intervalo de aproximadamente 100 a 3500 unidades nefelométricas por dosis.
8. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la cantidad de cada de *Leptospira* está en el intervalo de aproximadamente 200 a 2000 unidades nefelométricas por dosis.
9. La vacuna de combinación de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la que la cantidad de dicha cepa de virus CD en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 TCID₅₀ por dosis.
10. La vacuna de combinación de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la que la cantidad de dicha cepa de virus CAV-2 en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 TCID₅₀ por dosis.
- 30 11. La vacuna de combinación de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la que la cantidad de dicha cepa de virus CPI en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 TCID₅₀ por dosis.
12. La vacuna de combinación de la reivindicación 5 o la reivindicación 6, en la que la cantidad de dicha cepa atenuada de CPV en dicha vacuna está en el intervalo de 10^2 a 10^9 TCID₅₀ por dosis.
- 35 13. La vacuna de combinación de cualquiera de las reivindicaciones 4 y 6, en la que la cantidad de la preparación celular de dicha cepa de CCV en dicha vacuna es de al menos aproximadamente 100 unidades relativas por dosis.
14. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el vehículo comprende saponina y un tensioactivo.
15. La composición de vacuna de la reivindicación 14, en la que la saponina es Quil A y el tensioactivo es colesterol.
- 40 16. La composición de vacuna de la reivindicación 15, en la que la cantidad de Quil A está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis y la cantidad de colesterol está en el intervalo de 1 a 1000 µg por dosis.
17. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el vehículo comprende hidróxido de aluminio.
18. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicha composición se administra mediante una vía intravenosa, intranasal, oral, intramuscular o subcutánea.
- 45 19. La composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho perro recibe dicha composición dos o tres veces con un intervalo de aproximadamente 2-4 semanas entre administraciones.

Figura 1: Resumen de la media geométrica de los títulos finales de P68 ELISA en perros no vacunados y vacunados con p68 de Bordetella (15 µg/dosis) en exposición en aerosol a Bordetella Bronchiseptica

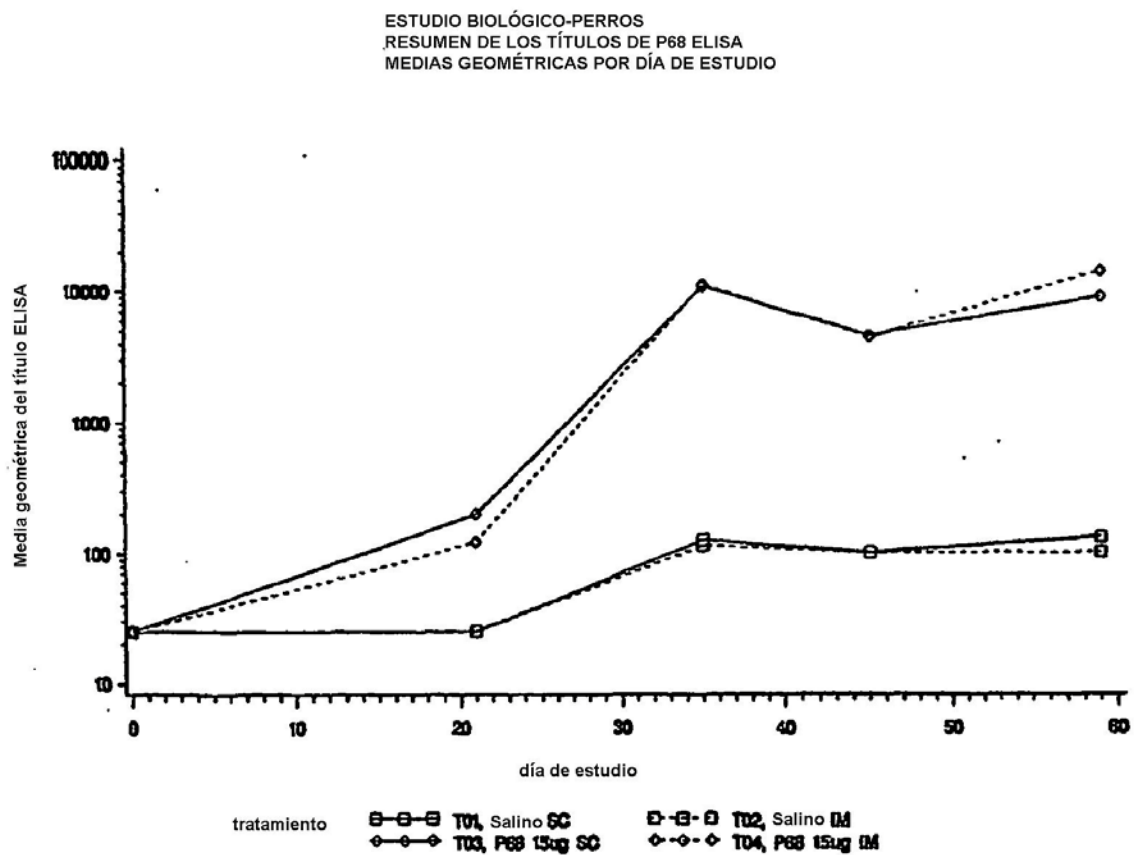


Figura 2: Resumen de los títulos de amiloide A sérico en perros tras la exposición en aerosol a *Bordetella Bronchiseptica*

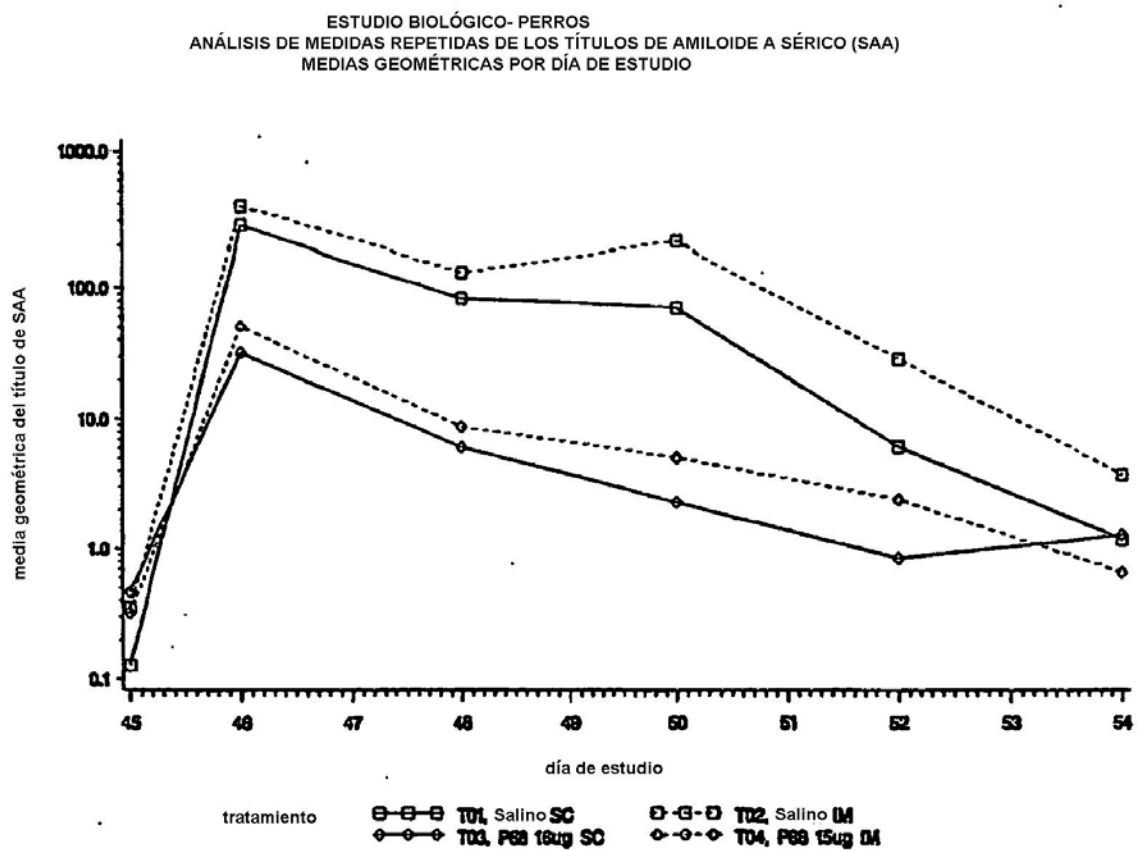
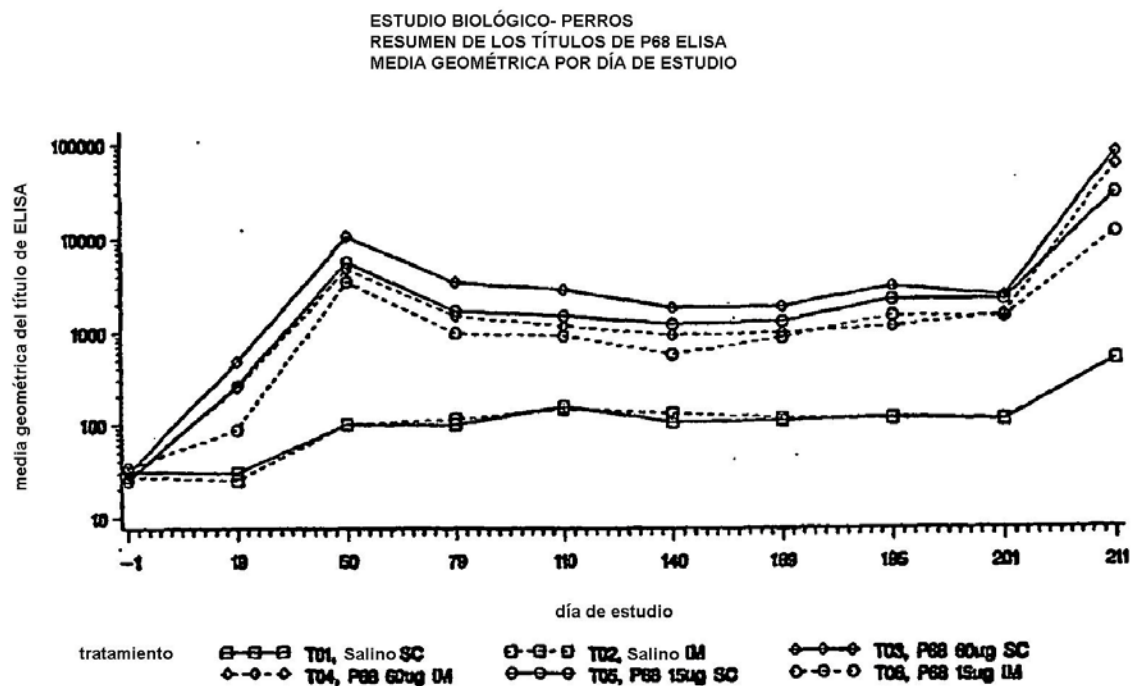


Figura 3. Resumen de la media geométrica de los títulos finales de p68 ELISA en perros no vacunados y vacunados con p68 de Bordetella tras la vacunación y la exposición en aerosol con Bordetella Bronchiseptica



El día 79 corresponde a datos combinados de los días 79 y 81, el día 110 corresponde a los días 110 y 111, el día 169 corresponde a los días 169 y 170

Figura 4. Resumen de los títulos de amiloide A sérico en perros tras la exposición en aerosol a Bordetella bronchiseptica

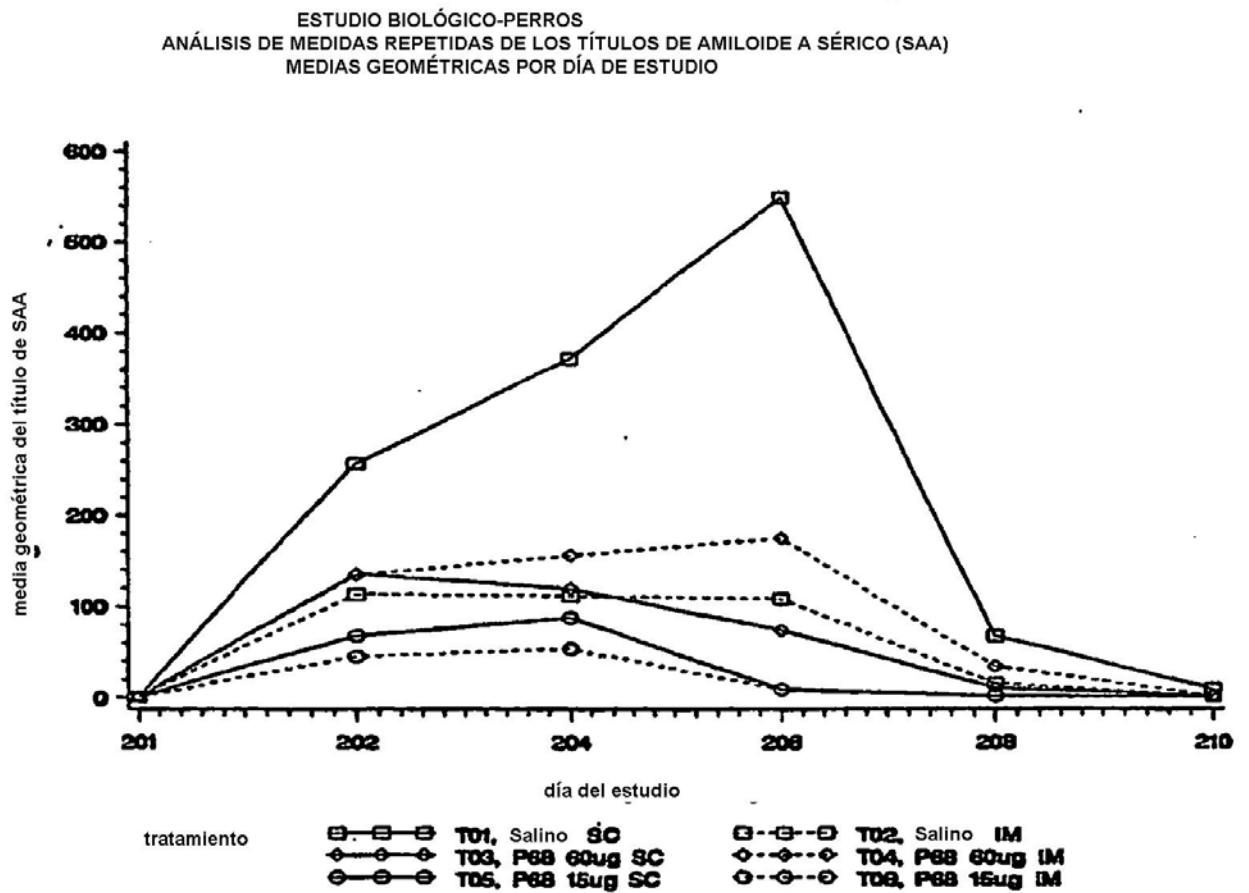
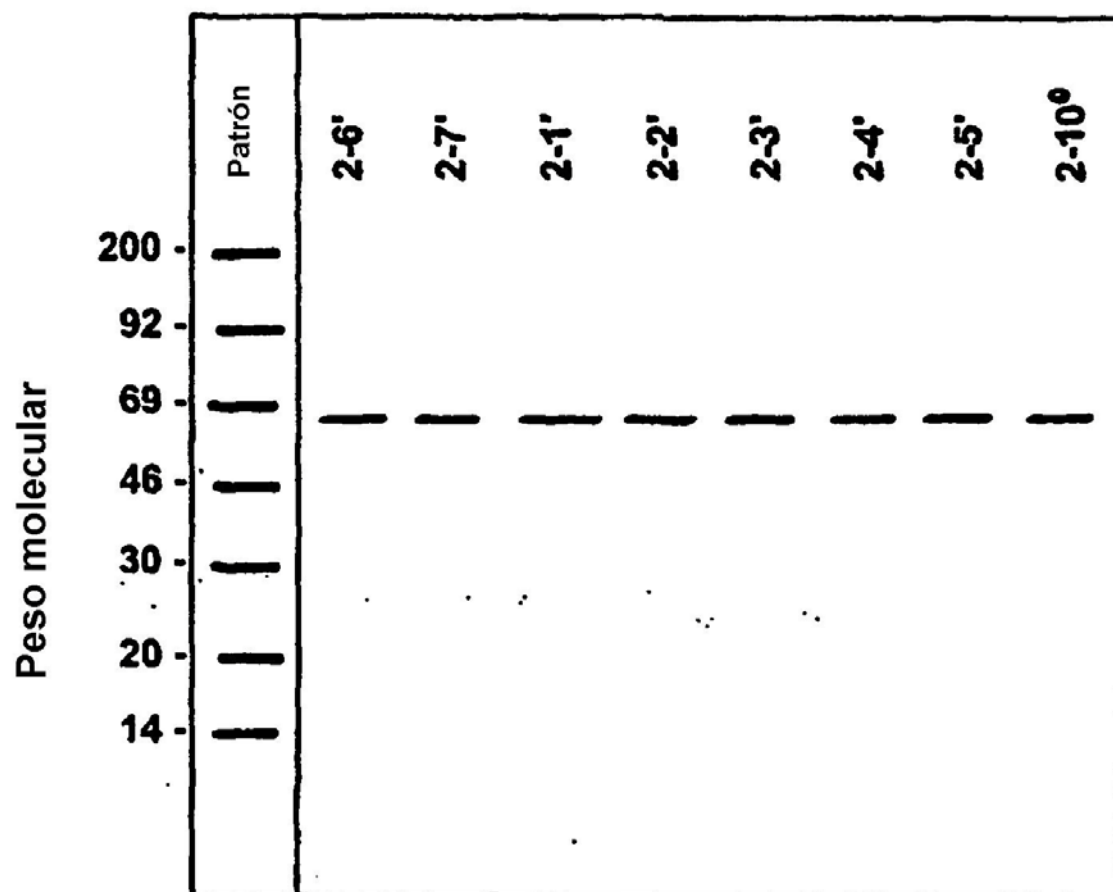


Figura 5



LISTADO DE SECUENCIAS

SEC ID N° 1

DPNTVSI I KAGERQHGIHIKQSDGAGVRTATGTTIKVSGRQAQGVLLNPAAELRFQNGSVTSSGQLFDEGVRRFL
 GTVT
 VKAGKLVADHATLANVSDTRDDGIALYVAGEQAQAS IADSTLQGAGGVRVERGANVTVQRSTIVDGGHLIGTLQP
 LQPE
 DLPPSRVVLGDTSVTAVPASGAPAAVS VFGANELTVDGGHITGGRAAGVAAMDGAIVHLQRATIRRGDAPAGGAVP
 GGAV
 PGGFGPLLDGWYGVDSVSDSTVDLAQS IVEAPQLGAAIRAGRGARVTVSGGSLSAPHGNVIETGGGARRFPPPASPL
 SITL
 RAGARAQGRALLYRVLPEPVKLTLAGGAQGGQDIVATELFP I PGASSGPLDVALASQARWTGATRAVDSL SIDNAT
 WVMT
 DNSNVGALRLASDGSVDFQQA EAGRFKVL MVDTLAGSGLFRMNVFADLGLSDKL VVMRDASGQHRLWVRNSGSEP
 ASAN
 TMLLVQTPRGSAAFTLANKDGKVDIGTYRYRLAANGNGQWSLVGAKAPPAPKPAQPGPQPGPQPPQPPQPPQ
 PQPP
 QRQPEAPAPQPPAGRELSAAANA AVNTGGVGLASTLWYAESN

SEC ID N° 2

GATCCAAACACTGTGTCAATCATCAAGGCCGGCGAGCGCCAGCACGGCATCCACATCAAGCAAAGCGATGGCGCCG
 GCGT
 ACGGACCGCCACCGGAACGACCATCAAGGTAAGCGGTCTGCAGGCCAGGGCGTCTCTGCGAAAATCCCGCGGCC
 GAGC
 TCGCGTTCCAGAACGGCAGCGTCACGTCTTCGGGACAGCTGTTCCAGCAAGGCGTCCGGCGCTTCTGGGCACCGT
 CACC
 GTCAAGGCCGGCAAGCTGGTCGCCGATCAGCCACGCTGGCCAAAGTCAGCGACACCCGGGACGACGACGGCATCG
 CGCT
 CTATGTGGCCGGCGAGCAGGCCAGGCCAGCATCGCCGACAGCACCTGCAGGGCGCGGGCGGCGTGCAGGTCGAG
 CGCG
 GCGCCAATGTACGGTCCAACGACGACCATCGTTGACGGGGGCTTGATATCGGCACCTGCAGCCGCTGCAGCC
 GGAA
 GACCTTCCGCCCAGCCGGGTGGTGCTGGGCGACACCAGCGTGACCGCCGTGCCCGCCAGCGGCGCGCCCGCGGCGG
 TGTC
 TGTATTCCGGGGCCAATGAGCTTACGGTTGATGGCGGGCACATCACCGGGGGGCGGGCAGCGGGGTGGCGGCCATG
 GACG
 GGGCGATCTGTGATCTGCAGCGCGGACGATACGGCGGGGGACGCGCTGCCGGCGGTGCGGTTCCAGGCGGTGC
 GGT
 CCGGCGGCTTCGGCCCCCTCTTGACGGCTGGTATGGCGTGGATGTATCGGACTCCACCGTGGACCTCGCTCAGT
 CGAT
 CGTCGAGGCGCCGAGCTGGGCGCCGCGATCCGGCGGGCGCGCGCCAGGGTGACGGTGTGCGGCGGCGAGCTTG
 TCCG
 CACCGCACGGCAATGTGATCGAGACGGCGGCGGTGCGCGTCTCCCGCTCCGGCTCGCCCCGTGTCGATCAC
 CTTG
 CGGGCGGGCGACGGGCGAGGGGAGGGCGCTGTGTACCGGGTCTGCCGGAGCCCGTGAAGCTGACGCTGGCGG
 GCGG
 CGCCAGGGGCGAGGGCGACATCGTCGCGACGGAGCTGCCTCCCATTCAGGCGCGTCGAGCGGGCGGCTCGACGTG
 GCGC
 TGGCCAGCCAGGCCCGATGGACGGGCGCTACCCGCGCGGTGACTCGCTGTCCATCGACAACGCCACCTGGGTGAT
 GACG
 GACAACTCGAACGTTCGGCGGCTGCGGCTGGCCAGCGACGGCAGCGTCGATTTCCAGCAGCCGGCCGAAGCTGGGC
 GGT
 CAAGGTCTGATGGTCGATACGCTGGCGGGTTCGGGGCTGTTCCGCATGAATGTCTTCGCGGACCTGGGGCTGAGC
 GACA
 AGCTGGTCTGTCATGCGGACGCCAGCGGCCAGCACAGGCTGTGGGTCCGCAACAGCGGCGAGCGGCGGCGAGCGC
 CAAC
 ACCATGCTGCTGGTGACGACGCCAGAGGCGCGGCGACCTTTACCTTGCCAACAAGGACGGCAAGGTCGATA
 TCGG
 TACCTACCGTATCGATTGGCCGCCAACGGCAATGGGCGAGTGAGCCTGGTGGGCGCGAAGGCGCGCGCGCGCC
 AAGC
 CCGCGCCGAGCCCGGTCCCCAGCCCGGTCCCCAGCCCGGTCCCCAGCCCGCGAGCCCGCGAGCCCGCGAGCC
 GCCA
 CAGAGGCGAGCCGAAGCGCCGCGCCGCAACCGCCGGCGGGCAGGGAGTTGTCCGCGCGCGCAACGCGGCGGTCA
 ACAC
 GGGTGGGGTGGGCTGGCCAGCACGCTCTGGTACGCCGAAGCAAT

SEC ID N° 3

DWNQSI IKAGERQHGIHIKQSDGAGVRTATGTTIKVSGRQAQGVLLENPAAE LRFQNG
SVTSSGQLPDEGVRRPLGTVTVKAGKLVDHATLANVSDTRDDGIALYVAGEQAQASI
ADSTLQAGAGVRVERGANVTVQRSTIVDGGLIHIGTLQPLQPEDLPSPRVVLGDTSVTAV
PASGAPAAVSVPFANELTVDGHHITGGRAGAASVAAMDGAIVHLQRATIRRGDAPAGGAVP
GGAVPGFGFPLLDGWYGVDVDSSTDVDLAQSI EAPALGAAIRAGRARVTVSGGSLSAP
HGNVIETGGGARFPFPASP LSITLQAGARAQGRALLYRVLPPEPKLTLAGAQQGGDI
VATELPPIPGASSGPLDVALASQARWTGATRAVDSL SIDNATWVM TDNSNVGALRLASD
GSVDFQQA EAGRFKCLMVD TLAGSGLFRMN VAFADLG LSDKLVVMRDASGQHRL LVRS
GSEPASGNTMLLVQT PRGSAATFTLANKDGKVD IGTYRYRLAANGNQWSLVGAKAPPA
PKPAPQPGPGPGPPQPPQPPQPPQRPQEAPAPQPPAGRELSAAANA AVNTGGVG LAS
TLWYAESN