

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 432 175**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.07.2004 E 08075914 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 2050463**

54 Título: **Composición de vacuna para vacunar a los perros contra la enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC)**

30 Prioridad:

01.07.2003 GB 0315323

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

02.12.2013

73 Titular/es:

**THE ROYAL VETERINARY COLLEGE (100.0%)
UNIVERSITY OF LONDON, ROYAL COLLEGE
STREET
LONDON NW1 0TU, GB**

72 Inventor/es:

**BROWNLIE, JOHN;
CHALKER, VICTORIA JANE y
ERLES, KERSTIN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 432 175 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición de vacuna para vacunar a los perros contra la enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC)

5 La presente invención se refiere a una composición de vacuna, y en particular a una composición de vacuna para su uso contra la enfermedad respiratoria infecciosa canina.

10 La enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC) es una enfermedad muy contagiosa común en perros domésticos y en condiciones de hacinamiento tales como en centros de acogida y residencias caninas o centros de entrenamiento. Muchos perros solo padecen una tos leve y se recuperan después de un breve periodo de tiempo, sin embargo, en algunos casos puede desarrollarse una bronconeumonía (Appel y Binn, 1987). La ERIC es raramente mortal pero retrasa la acogida de perros en centros de rescate y ocasiona la alteración de programas en perreras de entrenamiento así como costes de tratamiento considerables.

15 La patogénesis de ERIC se considera que es multifactorial, implicando a diversos virus y bacterias. Los agentes infecciosos que se considera que son los principales patógenos causantes de ERIC son el virus canino paragripal (CPIV)-(Binn y col, 1967), adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2) (Ditchfield y col, 1962), y herpesvirus canino (CHV) (Karpas y col, 1968a y 1986b), coronavirus respiratorio canino (CVRC) (WO 2004/011651 (The Royal Veterinary Collage) y Erles y col, 2003) y la bacteria *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*) (Bemis y col, 1977a, Keil y col, 1998).

20 Estos virus y bacterias han sido frecuentemente aislados durante los brotes y se ha demostrado que ocasionan síntomas respiratorios o lesiones pulmonares en infecciones experimentales (Appel y Percil 1970, Swango y col, 1970, Karpas y col, 1986b).

25 También se han aislado, de perros con síntomas de ERIC, reovirus humanos y especies micoplasmáticas (Lou y Wenner 1963, Randolph y col, 1993). También pueden ser importantes otros factores como el estrés.

30 *B. bronchiseptica* se describió como un agente etiológico primario en la enfermedad respiratoria "tos de las perreras" (Bemis y col, 1977b y Thompson y col, 1976). Ello predispone a los perros a la influencia de otros agentes respiratorios y con frecuencia existe simultáneamente con estos. La tos de las perreras puede reproducirse por exposición a *B. bronchiseptica* virulenta. Además, factores ambientales, tales como frío, corrientes de aire y alta humedad, con frecuencia condiciones típicas de las perreras, aumentan la susceptibilidad a la enfermedad (Ellis y col, 2001). Generalmente, los antibióticos se reconocen como agentes poco adecuados para tratar la enfermedad primaria (Ellis y col, 2001). Por el contrario, la inmunoprofilaxis para *B. bronchiseptica* proporciona un medio relativamente eficaz para ayudar al control de esta enfermedad.

40 El síntoma destacado de la infección por *B. bronchiseptica* es una tos seca, áspera, la cual es agravada por la actividad o excitación. La tos ocurre en paroxismos, seguida de arcadas para intentar limpiar pequeñas cantidades de mocos de la garganta. La temperatura corporal puede ser elevada a medida que tiene lugar una invasión bacteriana secundaria. Como la tos de las perreras es altamente contagiosa, la enfermedad puede ser rápidamente transmitida a perros susceptibles y produce una severa tos. Los más importantes signos salen al principio de dos a cinco días después de la infección, pero puede continuar en periodos ampliados. El stress, particularmente en condiciones medioambientales adversas, podría causar una recaída durante etapas posteriores de la enfermedad.

45 La tos de las perreras es normalmente una condición de vías respiratorias superiores y caracterizadas por secreción nasal y tos. Mientras que la tos de las perreras implica cambios en las vías respiratorias superiores, la patología ERIC indica que está involucrada en los daños al pulmón y, en algunos casos, bronconeumonía. La tos de las perreras es un síndrome más suave que ERIC y no tiene el ancho rango de patología descrita en ERIC. ERIC es también distinguido por un incremento en la severidad y mortalidad.

50 ERIC es un síndrome en perros que se presenta con signos respiratorios en un rango que va desde una enfermedad suave hasta la muerte. Se caracteriza por involucrar en la enfermedad las vías respiratorias superiores e inferiores con una progresión de patología desde inflamatoria hasta exudativa, edematosa y algunas veces hemorrágica que puede extenderse dentro del tejido pulmonar. ERIC puede también ocurrir en ausencia *B. bronchiseptica*, y en efecto algunos perros contraen ERIC al tiempo que no tienen *B. bronchiseptica* detectable, la cual indica que la tos de las perreras y ERIC son distintas infecciones.

60 También hemos confirmado la asociación de *B. bronchiseptica* con las enfermedades respiratorias aunque concluyendo que otros agentes están involucrados en las enfermedades respiratorias (Chalker y col, 2003).

65 Hemos demostrado ahora que *Streptococcus equi* subespecie *zooepidemicus* (vea ejemplo 1), *Mycoplasma cynos* (vea ejemplo 2) y una *Chlamydia* (vea ejemplo 3), están asociados con ERIC. Como todos los perros en nuestro estudio de población fueron vacunados contra CPIV y CAV-2, no teníamos nuevos datos para apoyar la implicación de estos virus en el ERIC. Sin embargo hemos encontrado un incremento en la frecuencia del herpesvirus canino en perros con síntomas de respiración graves (vea ejemplo 4).

Streptococcus equi subespecie *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) es un patógeno oportunista el cual es aislado frecuentemente de varios animales huéspedes, no solo de caballos. Es a menudo encontrado como un comensal de las vías respiratorias superiores en la extensión de las mucosas de mamíferos (Timoney y col, 1998; Quinn y col, 1999) y ha sido asociado con múltiples síndromes de enfermedades incluyendo la enfermedad de las vías respiratorias inferiores, neumonía de potro y cervicitis en caballos (Chanter, 1997; Biberstein y Hirsh, 1999), neumonía en llamas (Biberstein y Hirsh, 1999), septicemia y artritis en cerdos (Timoney, 1987), mastitis en vacas y cabras (Timoney y col, 1988), septicemia en aves de corral, pericarditis y neumonía en ovejas (Timoney, 1987), linfadenitis en cobayas (Quinn et al, 1999), glomerulonefritis en humanos (Balter y col., 2000) y meningitis en humanos (Ural y col, 2003). En perros, la *S. zooepidemicus* ha sido asociada con infecciones cruzadas y septicemia (Quinn y col, 1999) y neumonía hemorrágica necrótica aguda (Garnett et al, 1982).

Aunque los perros en sus últimas etapas de neumonía hemorrágica estreptocócica (NHE) comparten algunas características histológicas con perros con ERIC, este no es el caso en sus etapas iniciales (vea Chalker y col, 2003) y los trombos sépticos están presentes en NHE (Garnett et al, 1982). NHE tiene una rápida aparición que era mortal en la mayoría de los casos sin signos clínicos, donde el ERIC solo lo vimos como una aparición lenta con amplio rango de signos clínicos desde mucosidad nasal, tos, estornudos, arcadas, inapetencia, neumonía y bronconeumonía.

Mycoplasma cynos (*M. cynos*) ha estado asociada con la infección del conducto urinario canino (Jang y col, 1984). Ello ha sido identificado en los pulmones de un perro con el moquillo (Rosendal, 1978), y la inoculación endobronquial de *M. cynos* fue encontrada para inducir neumonía en perros (Rosendal & Vinther, 1977).

El moquillo canino descrito por Rosendal (1978) es una compleja enfermedad seguida de una infección con el virus de moquillo canino, varias especies de *mycoplasma* y la bacteria *Pseudomonas*. Esto es una combinación poderosa de desafíos microbianos y, no sorprendentemente, resulta en neumonía. La proporción de la patología se debe al *Mycoplasma* spp, y no fue claro. Posteriormente al desafío con *m. cynos* fue caracterizado sin ninguna señal de enfermedad en los perros aunque algunas lesiones inflamatorias locales pequeñas fueron halladas en 4 de cada 5 perros inoculados. La significancia de *M. cynos* en este síndrome fue, como Rosendal lo planteó, "dificultad para evaluar".

Las especies de *Chlamydophila* asociadas con ERIC están muy relacionadas con *Chlamydophila abortus* (*C. abortus*) por comparación de la secuencia de 218 nucleótidos en los 23 genes de ARNr. La secuencia de nucleótidos de esta región en estas especies de *Chlamidophila* (SEC ID NO: 1) es idéntica en más del 99 % para el *C. abortus*, 98,6 % idéntico para el *Chlamydophila psittaci* y 96,3 % idéntico para el *Chlamydophila felis*.

La especie de *Chlamydophila* fue identificada en la tráquea y los pulmones de los perros con ERIC. En cambio, la infección con *C. abortus* está normalmente asociada con trastornos reproductores, a menudo conduciendo a abortos no deseados, especialmente en ovejas. *C. abortus* no ha sido previamente descrito como una infección respiratoria en perros.

Hay pocas publicaciones que tratan de especies de *Chlamydiae* infecciosas en perros, y con lo cual muy pocas son conocidas de la diversidad de las especies *Chlamydiae* caninas. Recientemente, la *Chlamydia pneumoniae* (*C. pneumoniae*) ha estado asociado con la aterosclerosis en perros (Sako y col, 2002). También se ha identificado una *Chlamydophila* spp en un perro con poliartritis séptica (Lambrechts y col, 1999).

C. psittaci ha sido previamente aislada en las heces, cerebro, hígado, bazo, riñón y tejido pulmonar de perros domésticos (Asizmendi y col, 1992; Fraser y col, 1985 y Gresham y col, 1996). Estudios han demostrado que el 20 % de la población de las mascotas caninas en Alemania y 10 % en Japón han sido expuestos a y generado anticuerpos contra *Chlamydiaceae* (Perth y col, 1987 y Fukushi y col, 1985). El predominio de *C. psittaci* en perros seropositivos en Gran Bretaña es desconocido (Gresham y col, 1996). Los perros infectados con *C. psittaci* podría desarrollar infecciones crónicas sub-clínicas, aterosclerosis, artritis, conjuntivitis o incluso enfermedades respiratorias (Gresham y col, 1996, y Store 1988). Gresham y col, (1996) aislado *C. psittaci* de un perro con síntomas de enfermedad respiratoria aunque estos síntomas no eran tan severos como en ERIC. Ello sugiere que los perros podrían estar en reserva potencialmente y, con lo cual, importante en la epidemiología de infecciones humanas de *Chlamydiae* (Gresham y col, 1996; Perth 1989). Hay sólo un caso documentado de aislamiento en el cultivo celular de *C. psittaci* de un perro naturalmente infectado (Arizmendi y col, 1992), y un caso de aislamiento de perros infectados experimentalmente (Young y col, 1972).

Las vacunas están disponibles contra algunos agentes infecciosos asociados con ERIC, nombrado *B. bronchiseptica* tan bien como CPIV y CAV-2. Sin embargo, a pesar del uso de estas vacunas, ERIC es todavía prevalente en el mundo de las perreras, lo cual es posible debido a que las vacunas no proporcionan protección contra todos los agentes infecciosos involucrados en ERIC.

Por tanto, un primer aspecto de la invención proporciona una composición de vacuna adecuada para la vacunación de perros que comprende:

(a) un agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un perro contra *M. cynos*, en el que dicho agente comprende *M. cynos* inactivada o atenuada, que adicionalmente comprende:

(b) un agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un perro contra *S. zooepidemicus* como se indica en las reivindicaciones;

5 u otros agentes como se indica en las reivindicaciones.

Se aprecia que la composición contiene dos de estos agentes, por ejemplo (a) y (b). La composición puede contener tres agentes (a), (b) y (c) un agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un perro contra una *Chlamydomphila*.

Por un agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un perro contra un organismo particular, incluimos el significado de que, cuando se administra a un perro que no está inmunocomprometido o inmunosuprimido, el agente induce al sistema inmunitario del perro a producir anticuerpos que se unen específicamente al organismo. De esta manera, el agente es capaz de inducir una respuesta inmunoprotectora contra el organismo en particular.

Los agentes se indican en las reivindicaciones.

Preferentemente, el anticuerpo producido específicamente de esta manera, se une al organismo particular con una mayor afinidad que con cualquier otra molécula en el individuo. Preferentemente, el anticuerpo se une al organismo particular con una afinidad de al menos 2, o al menos 5, o al menos 10, o al menos 50 veces mayor que con cualquier otra molécula individual. Más preferentemente el anticuerpo se une al organismo particular con una afinidad de al menos 100, o al menos 1.000, o al menos 10.000 veces mayor que con cualquier molécula en el individuo.

Por agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra un organismo particular, hemos incluido el significado que, cuando se le administró al perro el cual no es inmunocomprometido o inmunosupresivo, el agente induce al sistema inmune del perro a producir anticuerpos los cuales se unen específicamente a macromoléculas como proteínas que son secretadas desde el organismo. Los anticuerpos podrían unir específicamente la macromolécula secretada como una toxina o hemolisina, e hincarla, además de reducir los cambios patogénicos en el huésped y la severidad de la enfermedad, de esta manera permitiendo que el huésped supere la infección en el huésped. De esta manera, a través de un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra un organismo particular, incluimos a agentes que son capaces de suscitar una respuesta inmunitaria que parta del organismo como una macromolécula secretada.

Las reivindicaciones indican los agentes necesarios para cada aspecto particular de la invención.

Normalmente, un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus* comprende *S. zooepidemicus*, inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifique dicho fragmento o dicho derivado (en cuyo caso dicho fragmento o dicho derivado comprende un polipéptido).

Streptococcus equi subespecie *zooepidemicus* se ha depositado en la NCTC (Depósito nº 4676. S34), en la ATCC (Depósito nº 43079) y en la Nacional Collection of Dairy Organims (NCDO) (Depósito nº 1358), y se describe por Farrow y col (1984).

Por un componente "inactivado" de una vacuna, incluimos el significado que la composición de la vacuna en particular, tal como una bacteria, micoplasma o virus, ha sido tratada de tal manera para eliminar su capacidad para causar la enfermedad, pero todavía mantiene su habilidad para provocar la inmunidad protectora. Por un componente de vacuna "inactivado" incluimos un organismo destruido.

Procedimientos para la inactivación y destrucción de organismos como bacterias, mycoplasmas y virus para el uso en una vacuna son bien conocidos en la técnica, y han sido usados, por ejemplo, en la preparación de algunos de los componentes para vacunas de perro descritas más adelante.

Hay muchos procedimientos para la desactivación de microorganismos por preparaciones de vacunas. El procedimiento más simple es la destrucción por calor (por ejemplo, calentando los virus a 58 °C durante 30 minutos, hirviendo la bacteria por 5 minutos o calentando a 65 °C durante una hora) o destruyendo por mezcla con formalina. Tu puedes también destruir microorganismos con otros varios compuestos químicos, o tratándolos con luz ultravioleta.

Por un componente "atenuado" de una vacuna, incluimos el significado que un componente particular de la vacuna, tal como la bacteria, micoplasma o virus, ha sido seleccionado o tratado de otra manera en tal forma que disminuya en gran medida su capacidad para causar la enfermedad pero todavía retenga su capacidad para provocar una inmunidad protectora.

Procedimientos para la atenuación de organismos como bacterias, mycoplasmas y virus para el uso en una vacuna son bien conocidos en la técnica, y han sido usados, por ejemplo, en la preparación de algunos componentes para vacunas de perros descritas más adelante.

5 Se pueden atenuar microorganismos a través de pases prolongados en una sedimentación diferente - por ejemplo en cultivos celulares para virus, y en un medio sólido o en un diferente huésped para bacterias, hasta que se nota una disminución en la virulencia. Alternativamente, se puede apuntar a la mutación o eliminar genes específicos en las bacterias las cuales están involucradas de esta manera a la limitación del potencial patogénico del organismo, o mutar el organismo de modo que tenga un requerimiento específico químico que no está presente en el animal huésped y así no puede multiplicarse y sobrevivir una vez en el huésped. La atenuación puede ser desarrollada en la bacteria con un tratamiento químico y un tratamiento de luz ultravioleta para causar las mutaciones indicadas en el genoma.

15 Un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* podría ser cualquier fragmento de *S. zooepidemicus* capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunoprotectora, de esta manera cuando un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* se administra a un perro no inmunocomprometido o inmunosupresivo, induce al sistema inmunitario del perro a producir anticuerpos que se unen a *S. zooepidemicus*.

20 Normalmente, el fragmento inmunogénico de un organismo en particular es un componente de la proteína de un organismo. A través de "un componente de proteína" de un organismo, incluimos el significado de una proteína entera, o una porción de una proteína. Ello se aprecia en que el fragmento de proteína podría ser o no glicosilada. De esta manera, por "la proteína" incluimos también la glicoproteína. La secuencia de aminoácidos de una glicoproteína se refiere a la secuencia de los aminoácidos de la estructura polipeptídica de la glicoproteína, independientemente del tipo, número, secuencia y posición de los azúcares adjuntos a esto.

25 Las proteínas de *S. zooepidemicus* incluyen precursores de proteínas de superficie celular (Genbank Accesoión Nos. AAA86832 y BAD00711), Cpn60 (Genbank Accesoión nº AAM88472), proteína similar a M (Genbank Accesoión Nos. AAP33082, AAP33081, AAP33080, AAP33079, AAP22285, AAB92635, AAB92634, AAB92633, AAB92632, AAB92631, AAB92630, AAB92629, AAB92628, AAB92627, AAB92626, AAB92625, AAB92624, AAB92623, 30 AAB92622, 2111310A y BAD00712), precursor de proteína similar a M (Genbank Accesoión No. AAD37432), precursor Szp2 de proteína similar a M (Genbank Accesoión No. AAF75674), precursor Szp3 de proteína similar a M (Genbank Accesoión No. AAF75675), precursor Szp4 de proteína similar a M (Genbank Accesoión No. AAF75676), la proteína similar a *Streptococcus pneumoniae* ORF5 (Genbank Accesoión No. BAB16041), la supuesta proteína adhesina de unión a metales (Genbank Accesoión No. CAB56710), factor inmunidad zocina A (Genbank Accesoión No. AAC46073) y las proteínas Szp descritas por Walker y col (1998, 2003; incluyendo Genbank Accesoión Nos. 35 AAQ08488-AAQ08510).

40 Es preferible, que el fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus*, sea una proteína estructural de *S. zooepidemicus* o una porción inmunogénica en sí. Más preferentemente, el fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus* es una toxina secretada, o hemolisina, o una proteína de adhesión/superficie, o una porción inmunogénica del mismo.

45 Las proteínas adicionales de superficie podrían ser aisladas de una bacteria como la *S. zooepidemicus* por procedimientos estándar conocidos de la piel de una persona en la técnica. Sambrook y col (2001) "Molecular Cloning a Laboratory Manual" 3ª edición, Sambrook y col (eds), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA, describe las técnicas de clonación bacterial que el mundo usa para este propósito.

50 Si el agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria es un componente de un organismo, tal como una proteína, esta podría aislarse de un cultivo del organismo. Es preferible, que las proteínas fabricadas por expresión de un adecuado ADN constructivo codifica la proteína usando la tecnología de ADN recombinante.

Técnicas adecuadas para la clonación, manipulación, modificación y expresión de ácidos nucleicos, y purificación de las proteínas expresadas, son bien conocidas en la técnica y son descritas por ejemplo en Sambrook y col (2001).

55 Alternativamente, las proteínas podrían fabricarse usando técnicas químicas proteínicas, por ejemplo usando una proteólisis parcial de proteínas aisladas (también exolíticamente o endolíticamente) o por sistemas de novo. Los péptidos pueden sintetizarse por el Fmoc-poliámidado hecha de la síntesis de una fase sólida como se describe en Lu y col (1981) *J. Org. Chem.* 46, 3433 y referencias del mismo.

60 Por "un derivado" de un fragmento inmunogénico de un organismo incluimos el significado de una proteína, o porción de una proteína, que se ha modificado a partir de la forma en la que está presente de manera natural en el organismo, pero que conserva la capacidad de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria, tal como la capacidad de inducir en un perro la producción de anticuerpos que se unen específicamente al organismo.

65 Por ejemplo, un derivado puede incluir una variedad de secuencia de la proteína o porción de la misma la cual podría ser usada para inducir la producción de anticuerpos los cuales se unen específicamente a ese organismo. Normalmente, las sustituciones de aminoácido son hechas para mejorar la antigenicidad de la vacuna.

Preferentemente, la variación de la secuencia es al menos el 90 % o al menos el 91 % o al menos el 92 %, o al menos el 93 %, o al menos el 94 % o al menos el 95 % idéntica a la secuencia original de la proteína o parte de la misma. Se prefiere más que la variación de la secuencia sea al menos el 96 %, o al menos el 97 %, o al menos el 98 % o al menos el 99 %, o al menos el 99,5 % idéntica a la secuencia original de la proteína o parte de la misma.

5 El porcentaje de la identidad de la secuencia entre dos polipéptidos puede determinarse usando programas de ordenador adecuados, por ejemplo, el programa GAP de la University of Wisconsin Genetic Computing Group. El porcentaje de identidad entre dos nucleótidos o dos secuencias de aminoácidos podrían determinarse usando GCG versión 10 (Genetics Computer Group, (1991)), Program Manual para el paquete informático GCG, Versión 7, abril 10 1991, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711). Los parámetros de GCG usados pueden ser: penalización 50 por creación de hueco, penalización 3 por extensión de hueco para el ADN, penalización 8 por creación de hueco y penalización 2 por extensión de hueco para la proteína. El porcentaje de identidad entre dos nucleótidos o dos secuencias de aminoácidos también puede determinarse usando FASTA versión 34 (Pearson WR. (1990) "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA". Procedimiento Enzymol.,183:63-98). 15 La configuración de FASTA puede ser penalización 16 por apertura de hueco y penalización 4 por extensión de hueco.

Se apreciará que el porcentaje de identidad es calculado en relación a polipéptidos cuya secuencia ha sido alineada óptimamente.

20 La alineación podría llevarse a cabo alternativamente usando el programa W Clustal (Thomson y col., (1994) Nucleic Acids Res 22, 4673-80). Los parámetros usados podrían ser los siguientes:

25 Los parámetros de alineamiento de emparejamiento rápido: k-tuple (palabra) tamaño; 1, tamaño de ventana; 5, penalización de hueco; 3, número de diagonales superiores; 5. Método de puntuación: x por ciento.

Parámetros de alineamientos múltiples: penalización por apertura de hueco; 10, penalización por extensión de hueco; 0.05. Matriz de puntuación: BLOSUM.

30 Normalmente, la variante de secuencia tiene menos de 100, o menos de 50, o menos de 40, o menos de 30, o menos de 20 restos de aminoácidos diferentes de la secuencia original de la proteína o parte de la misma. Más preferentemente, la variante secuencia tiene 15 o 14 o 13 o 12 o 11 o 10 o 9 o 8 o 7 o 6 o 5 o 4 o 3 o 2 o sólo un resto de aminoácido diferente de la secuencia original de la proteína o parte de la misma.

35 La secuencia de la derivada podría haber sido alterada para aumentar la inmunogenicidad del agente o podría no tener efecto en su inmunogenicidad. Por ejemplo, la derivada podría haber tenido una o más secuencias de aminoácidos que no son necesarios para eliminar la inmunogenicidad.

40 Por "derivativa" incluimos péptidos en los cuales uno o mas de un resto de aminoácido son químicamente modificados, antes o después de que el péptido sea sintetizado, proporcionando la función del péptido, nombrado la producción de anticuerpos específicos en vivo, continuando substancialmente no cargados. Tales modificaciones incluyen la formación de sales con ácidos o bases, orgánicos especialmente aceptables fisiológicamente o ácidos o bases inorgánicas, formando un éster o amida de un grupo carboxil terminal, y unido al aminoácido protector de grupos como N-t-butoxicarbonil. Tales modificaciones podrían proteger el péptido del metabolismo en vivo. 45 Péptidos podrían estar presentes como copias simples o múltiples, por ejemplo una repetición de tandem. Tal tandem o múltiples repeticiones podrían ser suficientemente antigenicos ellos mismos para obviar el uso de un portador. Ello podría ser ventajoso para el péptido que se forma en forma de un rizo, con unos extremos N-terminal y C-terminal que se unen juntos, o se añaden uno o más restos Cys en el extremo para aumentar la antigenicidad y/o para permitir que las uniones de sulfuro sean posibles. Si el péptido es unido covalentemente a un portador, 50 preferentemente un polipéptido, entonces el encuentro es preferentemente tal que el péptido de la invención forma un rizo.

En relación a las actuales teorías inmunológicas, una función del portador debería estar presente en cualquier formulación inmunogénica para estimular o aumentar la estimulación del sistema inmunitario. Se piensa que los mejores portadores representan (o, junto con el antígeno, crean) un epítipo de célula T. Los péptidos pueden asociarse, por ejemplo, por entrecruzamiento, con un portador distinto, tal como albúminas de suero, mioglobinas, toxoides bacterianos y hemocianina de lapa californiana. Más recientemente portadores desarrollados que inducen a ayudar a la célula-T en la respuesta inmunitaria, incluye el antígeno núcleo de la hepatitis-B (también denominado proteína nucleocapsidial), supuestos epítipos de células T, beta-galactosidasa y el péptido 163-171 de interleucina 1. El último componente se puede considerar de modo distinto, como un portador o como adyuvante o como ambos. 60 Alternativamente, muchas copias del mismo o diferentes péptidos de la invención pueden entrecruzarse entre sí; en esta situación no hay un portador distinto como tal, sino que puede proporcionarse una función del portador mediante dicho entrecruzamiento. Agentes de entrecruzamiento adecuados incluyen los indicados como tales en los catálogos de Sigma y Pierce, por ejemplo, glutaraldehido, carbodiimida y succinimidil 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, el último agente aprovechando el grupo -SH en el resto C-terminal de cisteína (si está presente). 65

Si el péptido es preparado por expresión de una secuencia de nucleótido adecuado en un huésped adecuado, entonces puede ser ventajoso expresar el péptido como un producto de fusión con una secuencia de péptido la cual actúa como un portador. El sistema Kabigen's "Ecosec" es un ejemplo de tal disposición.

5 Normalmente, la codificación del polinucleótido de la fracción inmunogénica de *S. zooepidemicus* codifica una proteína estructural, y más preferentemente una superficie de proteína de *S. zooepidemicus*, o una porción inmunogénica de la misma. Las secuencias de polinucleótidos codificadoras de varias proteínas de *S. zooepidemicus* pueden ser establecidas en referencia al Genbank Accession Nos. mencionado anteriormente. Sin embargo, la secuencia de polinucleótido codificadora de cualquier proteína inmunogénica de *S. zooepidemicus* puede ser determinada por técnicas estándar de biología molecular.

15 Normalmente, un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos* comprende *M. cynos* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos* o un derivado de los mismos, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

Las reivindicaciones indican los agentes necesarios para cada aspecto particular de la invención.

20 El *Mycoplasma cynos* se ha depositado en el NCTC (Deposito n. 10142H831) y en la ATCC (Deposito no. 27544) y se describe por Rosendal (1972).

25 Preferentemente, el fragmento inmunogénico de *M. cynos* es una proteína estructural de *M. cynos* o una porción inmunogénica de la misma, y más preferentemente, una proteína de superficie de *M. cynos* o una porción inmunogénica de la misma o un derivado de la misma. Las proteínas de superficie pueden aislarse de un micoplasma tal como *M. cynos* por procedimientos estándar conocidos por una persona con conocimiento de la técnica.

30 Procedimientos para la identificación e aislamiento de las proteínas de micoplasma son generalmente los mismos para una bacteria experta que algunos genes requieren vectores especializados que reconocen el uso el único codón de mycoplasmas (vea todos los capítulos en la Sección B, en *Genome Characterisation and Genetics*, In *Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasmaology*. Vol 1 Ed S. Razin & J. Tully. Academia Press Inc. 1995).

35 Las vacunas más eficaces de micoplasma tienden a contener una vacuna de célula entera inactivada por calor o formalina o viva atenuada, y en consecuencia conteniendo todas, o al menos la mayoría, de sus proteínas. Los componentes de micoplasma potenciales para el uso como vacunas incluyen proteínas como proteínas de membrana de estructura unida primaria, que se cree está entre 45kDA (equivalente a P1 citadhesina de *M. pneumoniae* y homólogos tal que MgPa de *M. genitalium* los cuales están en todas partes de el operón de tres genes), superficie expuesta a las proteínas y otras proteínas unidas, membrana glicolípida, fracción de membrana polisacarida, lipogliconas y todas las mencionadas en las revistas de vacunas de micoplasma animal (Barlie 1985 y Barile y col, 1985).

40 En una realización, el agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydomphila* comprende *C. abortus* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *C. abortus* o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

45 Everett y col depositaron *Chlamydomphila abortus* (Nº de depósito VR-656 en la ATCC) como cepa abortiva ovina clamidial B-577.

50 En otra realización, el agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydomphila* comprende *C. psittaci*, inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *C. psittaci* o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

Chlamydomphila psittaci, también conocida como *Chlamydia psittaci*, tiene el Nº de depósito VR-125 en la ATCC (Lillie (1930) página 1968, Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 274 (AL)).

55 En una realización adicional, el agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydomphila* comprende *C. felis*, inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *C. felis* o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

60 Everett y col depositaron *Chlamydomphila felis* (Nº de depósito VR-120 en la ATCC) como cepa No. 1 de neumonitis felina.

65 En otra realización, el agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydomphila* comprende *Chlamydia muridarum* inactivada o atenuada (ATCC VR 123, MoPn; Everett y col, 1999, Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 431); *Chlamydia pecorum* (ATCC VR 628, Bo/E58; Fukushi y Hirai 1992, Int. J. Syst. Bacteriol. 42: 307); *Chlamydia pneumoniae* (cepa tipo: TW-183; Grayston y col, 1989, Int. J. Syst. Bacteriol. 39: 88); *Chlamydia suis* (ATCC VR 1474, S45; Everett y col, 1999, Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 431); o *Chlamydia trachomatis* (especie tipo) (ATCC VR

571; Busacca 1935 Rake 1957 amend. Everett y col, 1999, Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 274(AL), o un fragmento inmunogénico del mismo, o un derivado del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o dicho derivado.

5 Un fragmento inmunogénico de *C. abortus*, *C. psittaci* o *C. felis*, o de *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. suis* o *C. trachomatis*, puede ser cualquier fragmento del mismo capaz de suscitar una respuesta inmunoprotectora en un perro. Normalmente, el fragmento inmunogénico es una proteína o una parte de la misma. Preferentemente, el fragmento inmunogénico es una proteína estructural o una parte inmunogénica de la misma. Más preferentemente, el fragmento inmunogénico es una proteína de superficie, o una parte inmunogénica de la misma o un derivado de la misma. Como se ha mencionado anteriormente, las proteínas de superficie pueden aislarse de una bacteria tal como
10 *Chlamydomphila* mediante procedimientos convencionales conocidos por un experto en la técnica.

Las proteínas de *C. abortus* incluyen la proteína de choque término GroEL de 60 kD (Nº de Registro Genbank AAD26144), la proteína del complejo de membrana rico en cisteína de 60 kDa (Nº de Registro Genbank AAG60550), la proteína de 90-kDa (Nos de Registro Genbank AAC44400, AAC44401), la proteína Omp-2 de membrana externa rica en cisteína (Nº de Registro Genbank AAD09597), DnaK (Nº de Registro Genbank AAN77259), el factor de elongación P (Nº de Registro Genbank AAK72389), GrpE (Nº de Registro Genbank AAN77258), HrcA (Nº de Registro Genbank AAN77257), la proteína de membrana externa principal (Nos de Registro Genbank AAK00237, CAA36152, CAD29327), el precursor de la proteína de membrana externa principal (Nos de Registro Genbank AAD29103, AAD29102, AAG53881, P16567), MutS (Nº de Registro Genbank AAD25864), Omp1 (Nos de Registro Genbank CAA06182, CAA06620, CAA06621, CAA06622, CAA06624, CAA06625, CAA06183, CAA06184), la proteína de membrana externa (Nº de Registro a Genbank AAB02850), la proteína 2 de membrana externa (Nº de Registro a Genbank AAD20336), el precursor POMP90A (Nº de Registro Genbank AAC15922), el precursor POMP90B (Nº de Registro Genbank AAC15924), el precursor POMP91A (Nº de Registro Genbank AAC15921), el precursor POMP91B (Nº de Registro Genbank AAC15923), la supuesta proteína de membrana externa de 98 kDa (Nº de Registro Genbank AAB18188), la supuesta proteína de membrana externa (Nº de Registro Genbank AAB 18187), la lipoproteína de membrana externa pequeña rica en cisteína (Nº de Registro Genbank AAG60549), la proteína rica en azufre (Nº de Registro Genbank AAG60551) y OmpA (Nos de Registro Genbank AAT36355 y AAT36356).

Las proteínas de *C. psittaci* incluyen precursores de la proteína de membrana externa rica en cisteína de 60K (Nos de Registro Genbank P23701, B39439, JC5204 y P27606); proteínas ricas en cisteína de 60K (Nos de Registro Genbank CAA37592 y CAA37591); el homólogo de chaperonina (No de Registro Genbank AAB22560); la fase de lectura abierta aguas arriba temprana (EUO) (Nos de Registro Genbank AAA23124, Q06566 y C36909); el homólogo de la proteína EUO (Nº de Registro Genbank JC5207); la proteína abortiva ovina (Nº de Registro Genbank 1601347A); la proteína específica de género (Nº de Registro Genbank AAB22559); la proteína de envoltura rica en cisteína de alto peso molecular (Nº de Registro Genbank AAB61619); la proteína similar a histona H1 (Nos de Registro Genbank AAA23132, JH0658, Q46204); la proteína hypA (Nº de Registro Genbank JL0116); la proteína hypB (Nº de Registro Genbank JL0117); proteínas hipotéticas (Nos de Registro Genbank JC5206, NP_052329, NP_052332, NP_052331, NP_052330, NP_052328, NP_052327, NP_052326, NP_052325, NP_052323, CAA44340, CAA44339, CAA44334, CAA44341, CAA44338, CAA44337, CAA44336, CAA44335, CAA44332, A39999, NP_052324, CAA44333, S61492, S18143, C39999, D39999, E39999, F39999, S18148, G39999, H39999 e I39999); las proteínas de membrana de inclusión (Nos de Registro Genbank 2108371A, S61491); la proteína de envoltura rica en cisteína de bajo peso molecular (Nº de Registro Genbank AAB61618); la proteína hipotética rica en lisina LRO (Nº de Registro Genbank B36909); la proteína de membrana externa principal y precursores (Nos de Registro Genbank CAA31177, 2006276A 1616229A, AAA23148, AAA23147, AAA17396, I40864, I40740, AAA23146, CAA40300, AAK00262, AAK00250, AAK00249, AAK00248, AAK00247, AAK00246, AAK00245, AAK00244, AAK00243, AAK00242, AAK00241, AAK00240, CAC84081, A60341, A40371, B60109, A60109, MMCWPM, MMCWP3, Q00087, P10332 y AAQ91209); el factor sigma principal (Nº de Registro Genbank AAA50747); MutS (Nos de Registro Genbank AAD25866 y AAD25863); la parte N-terminal de una proteína de función desconocida (Nº de Registro Genbank CAA90624); la ORF 2 (Nº de Registro Genbank 2108371B); la proteína 1 de membrana externa (Nos de Registro Genbank CAA76286 y CAB96859); el precursor de la proteína 3 de membrana externa (Nº de Registro Genbank JC5203); la proteína de función desconocida (Nº de Registro Genbank CAA90623); la supuesta proteína de membrana polimórfica (Nos de Registro Genbank AAL36963, AAL36962, AAL36961, AAL36960, AAL36959, AAL36958, AAL36957, AAL36956 y AAL36955); el precursor envA de proteína pequeña de envoltura rica en cisteína (Nº de Registro Genbank A39439); las proteínas ricas en azufre (Nos de Registro Genbank P28164, AAB61620 y JC5205); la proteína desconocida (Nos de Registro Genbank AAB22561 y AAB22558); la proteína pGP5-D de la familia parA de plásmidos de virulencia (Nº de Registro Genbank Q46263); la proteína pGP2-D de plásmidos de virulencia (Nº de Registro Genbank Q46260); la proteína pGP3-D de plásmidos de virulencia (Nº de Registro Genbank Q46261); la proteína pGP4-D de plásmidos de virulencia (Nº de Registro Genbank Q46262); la proteína pGP6-D de plásmidos de virulencia (Nº de Registro Genbank Q46264), OmpA (Nos de Registro Genbank AAT36351 y AAT36354) y la proteína chaperonina de 60 kDa (Nº de Registro Genbank AAT38208).

Las proteínas de *C. felis* incluyen la proteína de choque térmico GroEL (Nos de Registro Genbank AAL38954 y AAO24106); la proteína de membrana externa principal (Nos de Registro Genbank AAK00238, AAK00239, AA024108 y CAA43409); MutS (Nº de Registro Genbank AAD25865); y la proteína 2 de membrana externa (Nº de Registro Genbank AAK38113, AAK38114, AAK38115, AAL89722, AA024107, AAQ19779).

En una realización preferida, la proteína de *Chlamydophila* se usa como una proteína de membrana externa, tal como la proteína de membrana externa principal (MOMP). Otras proteínas de *Chlamydophila* adecuadas incluyen LPS o la proteína OmcB.

5 Normalmente, el polinucleótido que codifica la fracción inmunogénica de *C. abortus*, *C. psittaci* o *C. felis* codifica una proteína estructural, y más preferentemente, una proteína de superficie, o una parte inmunogénica de la misma, o un derivado de la misma. La secuencia de ácido nucleico que codifica las diversas proteínas puede determinarse fácilmente por referencia a los Nos de Registro Genbank anteriores y puede determinarse fácilmente mediante técnicas convencionales de biología molecular.

10 En una realización, el agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydophila* comprende una *Chlamydophila* inactivada o atenuada que tiene una secuencia parcial de 218 nucleótidos del gen ARNr 23 S que tiene la secuencia de la SEC ID N^o: 1, o un fragmento inmunogénico de la misma o un derivado de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción o derivado. Una *Chlamydophila* que tiene una secuencia parcial de 218 nucleótidos del gen ARNr 23 S que tiene la secuencia de la SEC ID N^o: 1 puede encontrarse en, y aislarse de, la tráquea y pulmones de perros con ERIC, normalmente perros con ERIC de centros de acogida y residencias caninas o centros de entrenamiento.

20 La *Chlamydophila* puede aislarse de perros inoculando un extracto tisular sobre una línea celular McCoy en presencia o en ausencia de cicloheximida, cultivando las células durante hasta 10 días a 37 °C con CO₂ al 5 % y después extrayendo la *Chlamydophila* por criofracturación de las células. Este procedimiento se usa rutinariamente para aislar *Chlamydophilas* de aves, gatos, seres humanos y otros huéspedes. El fragmento del gen ARNr 23 S puede amplificarse de la *Chlamydophila* usando las condiciones PCR descritas en el Ejemplo 3 y la secuencia obtenida puede verificarse por comparación con las secuencias indicadas en las Figuras 5 u 8.

25 Para su uso en vacunas, los agentes polinucleótidos pueden administrarse en diversos vectores replicantes (por ejemplo, vacunas de adenovirus recombinantes) o no replicantes (vacuna de ADN).

30 Una dosis típica de una vacuna, se compone de proteína recombinante de unos 5-10 µg. Una típica dosis de vacuna de bacteria es 10⁸ unidades formadoras de colonias por ml.

Tipicamente, la composición de la vacuna se compone además de un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

35 Anteriormente se han descrito determinados vehículos y adyuvantes. Otros adyuvantes adecuados incluyen adyuvante completo o incompleto de Freund, muramil dipéptido, los "Iscoms" de los documentos EP 109 942, EP 180 546 y EP 231 039, hidróxido de aluminio, saponina, DEAE-dextrano, aceites neutros (como el migliol), aceites vegetales (como aceite de cacahuete), liposomas, polioles Pluronic® o el sistema adyuvante Ribí (véase, por ejemplo, el documento GB-A-2189 141).

40 El vehículo(s) debe ser "aceptable" en cuanto a ser compatible con el agente(s) de la invención y no nocivo para el receptor del mismo. Normalmente, los vehículos serán agua o solución salina que serán estériles y sin pirógenos.

45 Normalmente, la vacuna se administrará por vía oral, intramuscular, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal o intranasal.

50 La composición de la vacuna podría ser formulada por administración parenteral, y podría incluir inyecciones de soluciones acuosas o no acuosas las cuales podrían contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos los cuales se administran en la formulación isotónica con la sangre del recipiente previsto; y/o suspensiones estériles acuosas o no acuosas las cuales podrían incluir agentes de suspensión y agentes espesadores.

55 La composición de la vacuna podría estar presente en contenedores unidos o multidosis, por ejemplo en ampollas y viales selladas, y podrían estar almacenadas en condición de hielo-seco (liofilizado) requiriendo sólo la adición de un líquido portador estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente anterior a su uso. Inyecciones de solución improvisadas y suspensiones podrían prepararse a partir de polvo, granulado o comprimidos.

60 La composición de la vacuna podría ser formulada por administración intranasal y podría desarrollarse convenientemente en forma de spray de aerosol presentándose en un contenedor presurizado, bomba, spray o nebulizador con el uso de un adecuado propulsor, como diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoro-etano, un hidrofluoroalcano tal como 1, 1, 1, 2-tetrafluoroetano (HFA 134ATM, o 1, 1, 1, 2, 3, 3, 3-heptafluoropropano (HFA 227 EATM), dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la dosis podría determinarse a través de una válvula para desarrollar un medidor de cantidad. El contenedor presurizado, bomba, spray o nebulizador podría contener una solución o suspensión del agente(s), usando una mezcla de etanol y el propulsor como el solvente, el cual puede contener adicionalmente un lubricante, como el trioleato sorbitano.

Para el uso veterinario, la vacuna es preparada como una formulación aceptable en relación con una práctica normal veterinaria el cirujano veterinario determinará el régimen de dosis y la vía de administración la cual será más apropiada para un animal en particular.

- 5 Formulaciones para vacunas adecuadas para la administración a perros son bien conocidas en la técnica e incluye las formulaciones usadas en vacunas de perros descritas más adelante.

10 Como se ha descrito anteriormente, la mayoría de los agentes virales y bacterianos conocidos se asocian a enfermedades respiratorias en perros, incluyendo coronavirus respiratorio canino (CVRC), virus canino paragripal (CPIV); adenovirus canino de tipo-2 (CAV-2), herpesvirus (CHV), y Bordetella bronchiseptica (B. bronchiseptica).

Por tanto, en una realización, la composición de la vacuna (como se indica en las reivindicaciones) comprende adicionalmente uno o más de: (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;

- 15 (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
 (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
 (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
 (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra B. *bronchiseptica*,

20 Los agentes son los indicados en las reivindicaciones.

De este modo, la composición de la vacuna también puede comprender opcionalmente cualquiera de dos, o cualquiera de tres, o cualquiera de cuatro, o todos estos cinco agentes adicionales.

- 25 Normalmente, un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC comprende el CVRC inactivado o atenuado, o un fragmento de inmunogénico del CVRC, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

30 En el documento WO 2004/011651 (The Royal Veterinary Colleague) y en Erles y col, 2003 se describen fragmentos inmunogénicos de CVRC adecuados. Como fragmentos inmunogénicos de CVRC adecuados se incluyen las proteínas de superficie Spike (S) y la hemaglutinina esterasa (HE), la glucoproteína de membrana (M), y la proteína nucleocapsidial (N), o porciones inmunogénicas de la misma. Las proteínas Spike y HE tipo CVRC descritas en WO 2004/011651 podrían ser también adecuadas como agentes que suscitan una respuesta inmunitaria contra CVRC. Relacionado con los coronavirus, como el coronavirus ovino y el coronavirus humano, y fragmentos inmunogénicos del mismo, podrían ser adecuados como agentes que suscitan una respuesta inmunitaria contra CVRC. Toda la descripción del documento WO 2004/011651 se refiere a la relación de agentes que pueden usarse como un componente de vacuna contra CVRC,

40 Normalmente, un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV comprende el CPIV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

45 Normalmente, un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2, comprende el CAV-2 inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

50 El adenovirus canino de tipo 1 produce hepatitis infecciosa; el adenovirus canino de tipo 2 produce enfermedad respiratoria. Ello ha demostrado que el CAV-1, proporciona protección cruzada contra CAV-2 y viceversa. Por tanto, el agente que suscita en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2 podría contener CAV-1 o CAV-2, o un fragmento inmunogénico del mismo. Las vacunas descritas más adelante contienen CAV-2 excepto en EURICAN® DHPPi, que no especifica el tipo de virus usado.

55 Agentes adecuados que suscitan una respuesta inmunitaria en un perro contra CPIV y CAV-2 son conocidos por una persona especializada en la técnica. Por ejemplo, en el RU se permiten las siguientes vacunas.

KAVAK® DA₂PiP69 de Fort Dodge Animal Health es una vacuna viva liofilizada que contiene cepas del virus del moquillo, adenovirus canino de tipo 2, virus canino paragripal de tipo 2 y parvovirus canino cultivado en tejido celular.

60 KAVAK® Paragripal de Fort Dodge Animal Health contiene una vacuna viva liofilizada derivada de una cepa atenuada del virus canino paragripal de tipo 2 cultivada en una línea celular homóloga establecida.

NOBIVAC® DHPPi de Intervet UK Limited es una vacuna de virus, viva, atenuada liofilizada que contiene virus canino del moquillo, adenovirus canino de tipo 2, parvovirus canino y virus paragripal canino cultivado en cultivo tisular de línea celular.

65

NOBIVAC® KC de Intervet UK Limited es una vacuna liofilizada modificada que contiene Bordetella bronchiseptica cepa B-C2 y la cepa del virus canino paragripal Cornell (esta es una vacuna intranasal). Su número de autorización de gestión es VM 06376/4026.

- 5 EURICAN® DHPPi de Merial Animal Health Ltd, es una vacuna viva combinada liofilizada contra el moquillo canino, la hepatitis infecciosa canina, el parvovirus canino y el virus canino paragripal de tipo 2.

VANGUARD® 7 de Pfizer Ltd, contiene el virus de moquillo canino vivo atenuado (cepa Snyder Hill), virus paragripal (cepa NL-CPI-5), parvovirus canino (NL-35-D) propagado en una línea celular establecida, y un cultivo inactivado de Leptospira canicola y Leptospira icterohaemorrhagiae.

10 QUANTUM® DOG 7 de Scherin-Plough Animal Health contiene el moquillo canino, adenovirus tipo 2, parvovirus, vacuna del virus paragripal de tipo 2 (viviente) y Leptospira canicola inactivada y vacuna de Leptospira icterohaemorrhagiae.

15 CANIGEN DHPPi de Virbac Ltd, es una vacuna de virus viva, atenuada, liofilizada que contiene el virus canino del moquillo, adenovirus canino (CAV-2), parvovirus canino y virus canino paragripal cultivado en cultivo tisular de línea celular.

20 CANIGEN Ppi de Virbac Ltd es una vacuna de virus viva, atenuada, liofilizada que contiene parvovirus canino y virus canino paragripal cultivado en cultivo tisular de línea celular.

Normalmente, un agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un perro contra CHV se compone de CHV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunológico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

Los agentes adecuados que suscitan en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV son conocidos para una persona con conocimientos en la técnica. Por ejemplo, EURICAN Herpes 205 de Merial es una sub-unidad de vacuna purificada contra CHV la es indicada para la inmunización activa de perras preñadas para prevenir la mortalidad, signos clínicos y lesiones en cachorros resultante de infecciones CHV adquiridas en los primeros días de vida. Ello no está autorizado para una vacuna de perros adultos para la prevención de enfermedades respiratorias.

Normalmente, un agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria en un perro contra B. bronchiseptica se compone de B. bronchiseptica activado o atenuado, o un fragmento inmunológico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicha fracción inmunogénica.

Agentes adecuados que suscitan una respuesta inmunitaria en un perro contra B. bronchiseptica son conocidos por personas especializadas en la técnica. Por ejemplo, las vacunas siguientes en los perros son autorizadas para el uso.

40 COUGHGUARD-B® de Pfizer Animal Health (U. S. Vet. Lic. No.:189) contiene un cultivo inactivo de B. bronchiseptica. Esto es para la inmunización de la salud de los perros contra la enfermedad causada por B. bronchiseptica, en particular la tos de las perreras. COUGHGUARD-B® es preparada de una cepa fuertemente antigénica de B. bronchiseptica la cual ha sido inactivada y procesada para ser no tóxica cuando se le administra a los perros. En los procedimientos de producción se informa del abandono de propiedades inmunológicas de B. bronchiseptica se quedan intactas.

VANGUARD®5/B de Pfizer Animal Health (U. S. Vet. Lic. No.:189) contiene cepas atenuadas del virus del moquillo canino (CDV), CAV-2, CPIV, y parvovirus canino (CPV) propagado en una línea celular canina establecida. El antígeno (CPV) fue atenuado por paso bajo en la línea celular canina y a ese nivel de paso tiene propiedades inmunológicas capaces de aumentar anticuerpos maternos. La vacuna se envasa en forma liofilizada con gas inerte en lugar de al vacío. El componente de la bacteria contiene cultivos enteros de B. bronchiseptica la cual se suministra como diluyente El componente de B. bronchiseptica en VANGUARD® 5/B se prepara de una cepa altamente antigénica la cual ha sido inactivada y procesada para ser no tóxica cuando se administra en perros.

55 NASAGUARD-B™ de Pfizer Animal Health (U. S. Vet. Lic. No.:112) está compuesto de un cultivo vivo avirulento de la bacteria B. bronchiseptica. PROGARD®-KC de Intervet es una vacuna intranasal viva modificada que contiene un virus canino paragripal atenuado y un cultivo vivo avirulento de Bordetella bronchiseptica. PROGARD®-KC es presentado en forma disecada con un diluyente estéril proporcionado por reconstitución. PROGARD®-KC es para la vacunación de cachorros y perros sanos, susceptibles para prevenir la traqueobronquitis infecciosa canina (“tos perruna”) debido al virus canino paragripal y B. bionchiseptica.

65 PROGARD®-KC PLUS de Intervet contiene cultivo vivo de cepas avirulentas de B. bronchiseptica, adenovirus canino atenuado tipo 2 y virus paragripal para administración intranasal. La vacunación con PROGARD®-Kc Plus estimula inmunidad local, rápida en el tracto respiratorio, inhibiendo de ese modo la infección en el puerto de entrada para prevenir síntomas clínicos. Además de inmunidad local, esta también estimula inmunidad sistemática a las tres

semanas de la administración intranasal. El pequeño volumen (0.4 ml) y la aplicación nasal de PROGARD®-KC Plus, proporciona facilitar la vacunación, particularmente en razas pequeñas y cachorros jóvenes. PROGARD®-KC Plus es presentado en una forma deshidratada con un diluyente estéril para la reconstitución. PROGARD®-KC Plus es para la vacunación de perros y cachorros sanos de tres semanas de edad o mayores para prevenir la traqueobronquitis canina infecciosa ("tos perruna") debido a adenovirus canino de tipo 2, virus paragripal y *B. bronchiseptica*.

Intrac de Intervet es una vacuna viva modificada liofilizada que contiene la cepa *B. bronchiseptica* S 55, para administración intranasal. El número de licencia del producto PL 0201/4011.

Nobivac® KC, descrita anteriormente, también contiene *B. bronchiseptica*.

En una realización, la composición de la vacuna (como se indica en las reivindicaciones) comprende:

- (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*; y, uno cualquiera o más de:
- (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*; (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
- (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- (f) un agente capaz de suscitar una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*.

Los agentes son los indicados en las reivindicaciones.

En una realización preferida, la composición de la vacuna comprende:

- (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*; y
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;

En otra realización preferida, la composición de la vacuna comprende:

- (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*; y
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC ;
- y uno cualquiera o más de:
- (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *Chlamydophila*;
- (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*.

De esta manera se aprecia que, además de los agentes (a) y (d), la composición puede contener dos agentes cualquiera de (c), (e), (f), (g) y (h), o cualquiera de tres o cualquiera de cuatro de los cinco agentes (c), (e), (f), (g) y (h).

En otra realización preferida, la composición de vacuna comprende

- (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*; y
- (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*; y
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC; y cualquiera de uno o más de:
- (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydophila*;
- (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*.

Se aprecia por tanto que, además de los agentes (a), (b) y (d), la composición puede contener dos agentes cualquiera de (c), (e), (f), (g) y (h), o cualquiera de tres o cualquiera de cuatro de los cinco agentes (c), (e), (f), (g) y (h).

Los agentes son como se indica en las reivindicaciones.

Se proporciona un procedimiento de vacunación de un perro contra una ERIC que comprende administrar al perro una composición de vacuna de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

Se proporciona un procedimiento de tratamiento de una ERIC en un perro que comprende administrar al perro una composición de vacuna de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

5 Por tanto puede observarse que la composición de vacuna del primer aspecto de la invención puede usarse para combatir una ERIC tanto profiláctica como terapéuticamente.

En un aspecto de la invención se proporciona el uso de:

10 (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, en el que dicho agente comprende *M. cynos* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento, en la preparación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una ERIC en un perro.

15 El medicamento puede comprender adicionalmente uno cualquiera o más de:

- (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*;
- (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydophila*;

20 En una realización, el medicamento comprende adicionalmente uno cualquiera o más de:

- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
- (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- 25 (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*.

En este y en todos los aspectos posteriores de la invención, la preferencias por (a), (b), (c), (d), (e), (f), (g) y (h) son como se describe con respecto al primer aspecto de la invención.

30 Los agentes son como se indica en las reivindicaciones.

Un aspecto de la invención proporciona el uso de:

35 (a) un agente capaz suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, en el que el agente comprende *M. cynos* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento; y opcionalmente uno cualquiera o más de

- (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*; y
- (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydophila*;

40 en la preparación de un medicamento para estimular en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos* y opcionalmente dicho respectivo cualquiera de uno o más de *S. zooepidemicus*, y una *Chlamydophila*.

En una realización, el medicamento comprende adicionalmente uno cualquiera o más de:

- 45 (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
- (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*.

50 Los agentes son como se indica en las reivindicaciones.

Un aspecto de la invención proporciona una composición que comprende:

55 (a) un agente capaz suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, en el que el agente comprende *M. cynos* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento; y opcionalmente uno cualquiera o más de

- (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*; y
- (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydophila*; para su uso en medicina canina veterinaria. Por tanto la composición se envasa y se presenta para su uso en medicina

60 veterinaria canina, es decir, se envasa y se presenta para su uso en perros.

Se aprecia que la composición puede contener cualquiera de dos de estos agentes, por ejemplo (a) y (b) o (a) y (c). La composición puede contener tres de estos agentes (a), (b) y (c).

65 En una realización la composición comprende adicionalmente uno o más de

- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
- (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- 5 (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*.

En una realización del este aspecto, la composición comprende:

- 10 (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos* y, opcionalmente, uno cualquiera o más de:
- (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*;
- (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *Chlamydomphila*;
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
- (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- 15 (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*

En una realización preferida de este aspecto, la composición comprende:

- 20 (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*; y
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC.

En otra realización preferida de este aspecto, la composición comprende:

- 25 (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*; y
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
- y uno cualquiera o más de:
- (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *Chlamydomphila*;
- 30 (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*

Se aprecia por tanto que, además de los agentes (a) y (d), la composición puede contener dos agentes cualquiera de (c), (e), (g) y (h), o cualquiera de tres o cualquiera de cuatro de los cinco agentes (c), (e), (f), (g) y (h).

En otra realización preferida de este aspecto, la composición comprende

- 40 (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*; y
- (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*; y
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC; y uno cualquiera o más de:
- (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydomphila*;
- 45 (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*.

Se aprecia por tanto que al igual que los agentes (a), (b) y (d), la composición puede contener dos agentes cualquiera de (c), (e), (f), (g) y (h), o cualquiera de tres, o cualquiera de cuatro de los cinco agentes (c), (e), (f), (g) y (h).

Los agentes son como se indica en las reivindicaciones.

Un aspecto de la invención proporciona un kit de partes como se indica en las reivindicaciones para una composición de vacuna, que comprende:

- 60 (a) un agente capaz suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, en el que el agente comprende *M. cynos* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento; y opcionalmente uno o más de
- (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus* como se indica en las reivindicaciones;

65 y otros agentes como se indica en las reivindicaciones y opcionalmente un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Se aprecia que el kit de partes puede contener cualquiera de dos de estos agentes, por ejemplo (a) y (b). El kit puede contener tres agentes (a), (b) y (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydomphila*.

5 En una realización, el kit comprende adicionalmente uno cualquiera o más de:

- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
- (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- 10 (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*.

En una realización de este aspecto, el kit comprende:

- 15 (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, y, uno cualquiera o más de:
- (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*;
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
- (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- 20 (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*

En una realización preferida de este aspecto, el kit comprende:

- 25 (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*; y
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC.

En otra realización preferida de este aspecto, el kit comprende:

- 30 (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*; y
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
- y uno cualquiera o más de:
- (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydomphila*;
- 35 (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*

40 Se aprecia por tanto que al igual que los agentes (a) y (d), el kit puede contener dos agentes cualquiera de (c), (e), (f), (g) y (h) o cualquiera de tres, o cualquiera de cuatro, de los cinco agentes (c), (e), (f), (g) y (h).

En otra realización preferida de este aspecto, el kit comprende:

- 45 (a) un agente capaz suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*;
- (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*; y
- (d) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC; y uno cualquiera o más de:
- (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydomphila*;
- (e) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
- 50 (f) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
- (g) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- (h) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*

55 Se aprecia por tanto que al igual que los agentes (a), (b) y (d), el kit puede comprender dos agentes cualquiera de (c), (e), (f) y (h) o cualquiera de tres, o cualquiera de cuatro, de los cinco agentes (c), (e), (f), (g) y (h).

Los agentes son como se indica en las reivindicaciones.

60 Se desvela un procedimiento para preparar un anticuerpo contra cualquiera de uno o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydomphila*, que comprende suscitar en un animal una respuesta inmunitaria contra uno cualquiera o más de dichos respectivos *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydomphila*, o un fragmento inmunogénico de los mismos, y preparar un anticuerpo del animal o de una célula inmortal derivada del mismo.

65 Los procedimientos y las técnicas para producir un anticuerpo monoclonal son bien conocidos por un experto en la técnica, por ejemplo, como los descritos en "Monoclonal Antibodies: A manual of techniques", H Zola (CRC Press, 1988) y en "Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications", J G R Hurrell (CRC Press, 1982).

Se desvela un procedimiento de obtención de un anticuerpo contra cualquiera de uno o más de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydomphila*, que comprende seleccionar un anticuerpo de una biblioteca de presentación de anticuerpos usando uno cualquiera o más de dichos respectivos *S. zooepidemicus*, *M. cynos* o una *Chlamydomphila*, o un fragmento inmunogénico de los mismos.

5 En una realización, la *Chlamydomphila* es *C. abortus* o *C. psittaci* o *C. felis*. En otra realización, la *Chlamydomphila* es *C. muridarum*, *C. pecorum*, *C. pneumoniae*, *C. suis* o *C. trachomatis*.

10 Se desvela un anticuerpo que se une específicamente a *S. zooepidemicus*, a *M. cynos* o a una *Chlamydomphila*. Esto puede realizarse mediante los procedimientos proporcionados anteriormente.

15 En una realización, el anticuerpo que se une específicamente a una *Chlamydomphila* se une a *C. abortus* o a *C. psittaci* o a *C. felis*. En otra realización el anticuerpo que se une específicamente a una *Chlamydomphila* se une a *C. muridarum*, a *C. pecorum*, a *C. pneumoniae*, a *C. suis* o a *C. trachomatis*.

20 En el contexto de este aspecto y en aspectos posteriores de la invención, el término "anticuerpo" no solo incluye moléculas de inmunoglobulina completa sino también fragmentos de las mismas, tales como, Fab, F(ab')₂, Fv y otros fragmentos de las mismas que conservan el sitio de unión a antígeno. De manera similar, en estos contextos, el término "anticuerpo" incluye derivados modificados genéticamente de anticuerpos, tales como, moléculas de Fv monocatenarias (scFv) y anticuerpos de domino (dAbs). El término también incluye moléculas similares a anticuerpos que pueden producirse usando técnicas de presentación de fagos u otras técnicas de selección al azar para moléculas que se unen al organismo particular o a regiones del organismo particular. Por tanto, en estos contextos, el término anticuerpo incluye todas las moléculas que contienen una estructura, preferentemente una estructura peptídica, que es parte del sitio de reconocimiento (es decir, la parte del anticuerpo que se une o se combina con el epítipo o antígeno) de un anticuerpo natural.

25 Los dominios pesado variable (V_H) y ligero variable (V_L) del anticuerpo están implicados en el reconocimiento antigénico, un hecho reconocido primero por experimentos de digestión temprana con proteasas. Confirmación adicional se encontró por "humanización" de anticuerpos de roedores. Los dominios variables de origen roedor pueden fusionarse con dominios constantes de origen humano, de tal manera que, el anticuerpo resultante conserva la especificidad antigénica del anticuerpo roedor progenitor (Morrison y col (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 81,6851-6855).

30 A partir de experimentos que implican la expresión bacteriana de fragmentos de anticuerpos, conteniendo todos ellos uno o más dominios variables, se sabe que esa especificidad antigénica la confieren los dominios variables y que es independiente de los dominios constantes. Estas moléculas incluyen moléculas similares a Fab (Better y col (1988) Science 240, 1041); moléculas Fv (Skerra y col (1988) Science 240, 1038); moléculas Fv monocatenarias (ScFv) en las que los dominios compañeros V_H y V_L están unidos mediante un oligopéptido flexible (Bird y col (1988) Science 242, 423; Huston y col (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos 85, 5879) y anticuerpos de dominio sencillo (dAbs) que comprenden dominios V aislados (Ward y col (1989) Nature 341, 544). Una revisión general de las técnicas implicadas en la síntesis de fragmentos de anticuerpos que conservan sus sitios de unión específicos se encuentra en Winter & Milstein (1991) Nature 349, 293-299.

35 Por "moléculas ScFv" se entiende moléculas en las que los dominios compañeros V_H y V_L están unidos mediante un oligopéptido flexible. Pueden fabricarse anticuerpos modificados por ingeniería genética, tales como anticuerpos ScFv, usando las técnicas y estrategias descritas en J. Huston y col, (1988) "Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an antidigoxin single chain Fv analogue produced in *E. coli*", Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 85, págs. 5879-5883, y en A. Pluckthun, (junio 1991) "Antibody engineering; Advances from use of *E. coli* expression systems", Bio/technology vol 9.

40 Las ventajas de usar fragmentos de anticuerpos, en lugar de anticuerpos completos, son diversas. Un tamaño más pequeño de los fragmentos puede conducir a mejorar las propiedades farmacológicas, tales como, una mejor penetración en el sitio diana. Las funciones efectoras de los anticuerpos completos, tales como unión al complemento, se eliminan. Todos los fragmentos de anticuerpos Fab, Fv, ScFv y dAb pueden expresarse en, y secretarse a partir de, *E. coli*, permitiendo así una producción fácil de grandes cantidades de los fragmentos.

45 Los anticuerpos completos y los fragmentos F(ab')₂ son "bivalentes". Por "bivalente" se entiende que los anticuerpos y los fragmentos F(ab')₂ tienen dos sitios de combinación con el antígeno. Por otro lado, los fragmentos Fab, Fv, ScFv y dAb son monovalentes y solo tienen un sitio de combinación con el antígeno.

50 Aunque el anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, se prefiere que este sea un anticuerpo monoclonal. En algunas circunstancias, particularmente si el anticuerpo va a administrarse a un perro repetidas veces, se prefiere que el anticuerpo monoclonal sea un anticuerpo monoclonal de perro o un anticuerpo "caninizado".

55 Los anticuerpos policlonales pueden producirse para que sean poliespecíficos o mono-específicos. Se prefiere que sean mono-específicos. Los anticuerpos quiméricos se describen en Neuberger y col (1998, 8^o International

Biotechnology Symposium Parte 2, 792-799).

Se prefiere que el anticuerpo sea un anticuerpo "caninizado". Se conocen formas de preparar adecuadamente anticuerpos que no son de perro para "caninizarlos", por ejemplo, insertando las regiones CDR de anticuerpos de ratón en las regiones marco conservadas de anticuerpos de perro. Los anticuerpos caninizados pueden prepararse usando técnicas y estrategias correspondientes a las descritas para la humanización de anticuerpos en M. Verhoeyen, C. Milstein y G. Winter (1988) "Reshaping human antibodies: Grafting an antilysozyme activity", *Science*, 239, 1534-1536, y en C. Kettleborough y col., (1991) "Humanisation of a mouse monoclonal antibody by CDR grafting; The importance of framework residues in loop conformation", *Protein Engineering*, 14(7), 773-783.

Se aprecia que un perro puede adquirir inmunidad de modo pasivo contra una ERIC administrando un anticuerpo que reaccione con un agente que esté implicado en la enfermedad.

Por tanto, se desvela un procedimiento de inmunización de modo pasivo de un perro contra una ERIC que comprende administrar al perro uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más respectivos de *S. zooepidemicus*, *M. cynos*, y a una *Chlamydophila*.

Usando técnicas convencionales, tales como las descritas anteriormente, pueden prepararse y obtenerse anticuerpos que se unen específicamente a *S. zooepidemicus*, a *M. cynos* y a la *Chlamydophila*.

Se aprecia que la ERIC en un perro puede tratarse administrando un anticuerpo que reaccione con un agente que esté implicado en la enfermedad.

Se desvela un procedimiento de tratamiento de una ERIC en un perro que comprende administrar al perro uno o más anticuerpos que se unen específicamente a uno o más respectivos de *S. zooepidemicus*, *M. cynos* y a una *Chlamydophila*.

En una realización, el anticuerpo que se une específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. abortus*, o a *C. psittaci*, o a *C. felis*. En otra realización el anticuerpo que se une específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. muridarum*, a *C. pecorum*, a *C. pneumoniae*, a *C. suis* o a *C. trachomatis*.

En una realización, el procedimiento comprende adicionalmente administrar anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera de uno o más de CVRC, CPIV, CAV-2, CHV y *B. bronchiseptica*.

Los anticuerpos que se unen específicamente a CVRC, CPIV, CAV-2, CHV y a *B. bronchiseptica* pueden prepararse usando técnicas convencionales tales como las descritas anteriormente.

Un aspecto de la invención proporciona el uso de uno o más anticuerpos que se unen específicamente a *M. cynos* y opcionalmente a uno o más respectivos de *S. zooepidemicus*, y una *Chlamydophila*, en la preparación de un medicamento para inmunizar de manera pasiva a un perro contra una ERIC.

Un aspecto de la invención proporciona el uso de uno o más anticuerpos que se unen específicamente a *M. cynos* y opcionalmente a uno o más respectivos de *S. zooepidemicus*, y una *Chlamydophila*, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de una ERIC en un perro.

En una realización de estos aspectos, el anticuerpo que se une específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. abortus* o a *C. psittaci* o a *C. felis*. En otra realización, el anticuerpo que se une específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. muridarum*, a *C. pecorum*, a *C. pneumoniae*, a *C. suis* o a *C. trachomatis*.

En una realización de estos aspectos, el medicamento comprende adicionalmente anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera de uno o más de CVRC, CPIV, CAV-2, CHV y *B. bronchiseptica*.

Se desvela una composición que comprende cualquiera de dos o más de un anticuerpo que se une específicamente a *S. zooepidemicus*, un anticuerpo que se une específicamente a *M. cynos* y un anticuerpo que se une específicamente a *Chlamydophila*.

En una realización, el anticuerpo que se une específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. abortus*, o a *C. psittaci* o a *C. felis*. En otra realización el anticuerpo que se une específicamente a la *Chlamydophila* se une a *C. muridarum*, a *C. pecorum*, a *C. pneumoniae*, a *C. suis* o a *C. trachomatis*.

En una realización, la composición comprende adicionalmente anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera de uno o más de CVRC, CPIV, CAV-2, CHV y *B. bronchiseptica*.

También se apreciará que la invención incluye procedimientos de diagnóstico y ensayos.

Se desvela un procedimiento para determinar si un perro se ha expuesto a una especie de *Chlamydomphila* asociada con una ERIC, comprendiendo el procedimiento:

- 5 (a) obtener una muestra adecuada del perro; e
 (b) identificar en la muestra una especie de *Chlamydomphila*, o un anticuerpo contra la misma, asociado con una ERIC.

10 Normalmente, la especie de *Chlamydomphila* es una que tiene un ARN 23S que comprende la secuencia (cuando se muestra como ARN) de cualquiera de las SEC ID Nos: 1 a 8 (véanse las Figuras 5 y 8 que muestran secuencias parciales de ARN 23S, y el Ejemplo 3).

La invención también proporciona un procedimiento para determinar si un perro tiene, o es susceptible a tener, una ERIC, comprendiendo el procedimiento;

- 15 (a) obtener una muestra adecuada del perro; e
 (b) identificar en la muestra *M. cynos*, o un anticuerpo contra *M cynos*, y opcionalmente uno cualquiera o más de *S. zooepidemicus* o *Chlamydomphila*, o un anticuerpo contra cualquiera de estos.

20 En un realización, se apreciará que los procedimientos pueden detectar en la muestra, la presente exposición al organismo, por ejemplo, detectando el propio organismo o un componente del mismo (tal como una proteína o un ácido nucleico). Los procedimientos también pueden detectar una exposición anterior al organismo detectando en la muestra anticuerpos que están dirigidos contra el organismo o contra componentes del mismo.

25 Normalmente, la muestra es cualquier muestra adecuada que incluya muestras que contengan anticuerpos, tales como, suero, saliva, lavado traqueal y lavado bronquiolar.

30 Por tanto, la presencia del organismo en el perro, del cual procede la muestra, puede determinarse analizando la muestra con respecto a la presencia del organismo o componente del mismo. Por ejemplo, para componentes de ácido nucleico, que incluyen ARN 23S, el ácido nucleico se extrae y, si fuera necesario, puede copiarse en ADN, y detectarse, por ejemplo, usando técnicas que implican hibridación a alta rigurosidad, amplificación específica, secuenciación de nucleótidos y otros procedimientos bien conocidos por el experto en la técnica (Sambrook y col/ (2001) citado anteriormente). Por "hibridación a alta rigurosidad" se entiende que el polinucleótido y el ácido nucleico, con el que se hibrida, tienen suficiente similitud de secuencia de nucleótidos de manera que pueden hibridarse en condiciones de alta rigurosidad. Como se sabe en la técnica, la rigurosidad de la hibridación de los ácidos nucleicos depende de factores tales como la longitud del ácido nucleico sobre el que se produce la hibridación, el grado de identidad de las secuencias a hibridar, y de factores tales como temperatura, fuerza iónica y contenido en CG o AT de la secuencia. Los ácidos nucleicos que pueden hibridarse a alta rigurosidad con moléculas de ácido nucleico del organismo incluyen ácidos nucleicos que tienen una identidad de secuencia >90 %, preferentemente los que tienen una identidad de secuencia >95 % o >96 % o >97 % o >98, más preferentemente aquellos los que tienen una identidad de secuencia >99 %, sobre al menos una parte del ácido nucleico del organismo.

45 En la técnica se conocen condiciones de hibridación de alta rigurosidad típicas que conducen a hibridación selectiva, como por ejemplo, las descritas en Sambrook y col 2001 (citado anteriormente).

Es un ejemplo de una solución de hibridación típica, cuando un ácido nucleico se inmoviliza sobre una membrana de nylon y el ácido nucleico sonda tiene ≥ 500 bases:

- 50 6 x SSC (solución salina de citrato sódico)
 Dodecil sulfato sódico (SDS) al 0,5 %
 ADN de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado, 100 $\mu\text{g/ml}$

La hibridación se realiza a 68 °C. La membrana de nylon, con la que se inmoviliza el ácido nucleico, puede lavarse a 68 °C en 0,1 x SSC.

55 20 x SSC puede prepararse de la siguiente manera. Se disuelven 175,3 g de NaCl y 88,2 g de citrato sódico en 800 ml de H₂O. Se ajusta el pH a 7,0 con unas cuantas gotas de una solución de NaOH 10 N. El volumen se ajusta a 1 litro con H₂O. Se dispensa en alícuotas. Se esteriliza en autoclave.

60 Es un ejemplo de una solución de hibridación típica, cuando un ácido nucleico se inmoviliza sobre una membrana de nylon y la sonda es un oligonucleótido que tiene entre 15 y 50 bases:

- 65 Cloruro de trimetilamonio (TMAC1) 3,0 M
 Fosfato sódico 0,01 M (pH 6,8)

EDTA 1 mm (pH 7,6)

SDS al 0,5 %

5 ADN de esperma de salmón fragmentado, desnaturalizado, 100 µg/ml

Leche deshidratada desgrasada al 0,1 %

10 La temperatura óptima para la hibridación se selecciona normalmente para que esté 5 °C por debajo de la T_i para la longitud de cadena determinada. La T_i es la temperatura de fusión irreversible del híbrido formado entre la sonda y su secuencia diana. Jacobs y col (1988) Nucl. Acids Res. 16, 4637 analizan la determinación de las T_i . La temperatura de hibridación recomendada para oligómeros de 17 unidades en TMAcI 3M es de 48-50 °C; para oligómeros de 19 unidades, es de 55-57 °C; y para oligómeros de 20 unidades es de 58-66 °C.

15 El ensayo de un componente proteico del organismo en una muestra del perro puede realizarse usando cualquier procedimiento conocido en la técnica. Normalmente, dichos procedimientos se basan en la unión de anticuerpos, y el anticuerpo se une al organismo o a un componente del mismo.

20 Por ejemplo, la expresión de proteínas del organismo puede estudiarse con procedimientos inmunohistológicos clásicos. En estos, el reconocimiento específico lo proporciona el anticuerpo primario (policlonal o monoclonal) pero el sistema de detección secundario puede utilizar anticuerpos fluorescentes, enzimas u otros anticuerpos secundarios conjugados. Como resultado, se obtiene una tinción inmunohistológica de la sección tisular para el examen patológico. Los tejidos también pueden extraerse, por ejemplo, con urea y detergente neutro, para la liberación de proteínas en ensayos de transferencia de Western o puntual/por ranuras (Jalkanen, M., y col, J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M., y col, J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)). En esta técnica, que se basa en el uso de fases sólidas catiónicas, la cuantificación de la proteína puede realizarse usando, como patrón, proteínas aisladas. Esta técnica también puede aplicarse a muestras líquidas corporales.

30 Otros procedimientos basados en anticuerpos, útiles para detectar la expresión de proteínas, incluyen inmunoensayos, tales como, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y radioinmunoensayo (RIA). Por ejemplo, un anticuerpo monoclonal reactivo puede usarse como una sonda inmunoabsorbente y como una sonda marcada con enzimas para detectar y cuantificar la proteína. La cantidad de proteína presente en la muestra puede calcularse por referencia con la cantidad presente en una preparación convencional usando un algoritmo informático de regresión lineal. Dicho ELISA, para detectar un antígeno tumoral, se describe en Iacobelli y col, Breast Cancer Research and Treatment 11: 19-30 (1988). En otro ensayo ELISA, pueden usarse dos anticuerpos monoclonales específicos distintos para detectar la proteína en un líquido corporal. En este ensayo, uno de los anticuerpos se usa como la sonda inmunoabsorbente y el otro como la sonda marcada con enzimas.

40 Las técnicas anteriores pueden realizarse esencialmente como un ensayo en "una etapa" o en "dos etapas". En ensayo en "una etapa" implica poner en contacto la proteína con un anticuerpo inmunizado y, sin lavar, poner en contacto la mezcla con el anticuerpo marcado. El ensayo en "dos etapas" implica lavar antes de poner en contacto la mezcla con el anticuerpo marcado. También pueden emplearse otros procedimientos convencionales según sea adecuado. Normalmente se desea inmovilizar un componente del sistema de ensayo en un soporte, lo que permite que otros componentes del sistema se pongan en contacto con el componente y se eliminen fácilmente de la muestra.

50 Como marcadores enzimáticos adecuados se incluyen, por ejemplo, los del grupo de las oxidasas, que catalizan la producción de peróxido de hidrógeno al reaccionar con el sustrato. La glucosa oxidasa se prefiere particularmente ya que tiene una buena estabilidad y su sustrato (glucosa) se encuentra fácilmente disponible. La actividad de un marcador oxidasa puede ensayarse midiendo la concentración de peróxido de hidrógeno formada por la reacción anticuerpo marcado con enzima/sustrato. Además de las enzimas, otros marcadores adecuados incluyen radioisótopos, tales como yodo (^{125}I , ^{131}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{112}In) y tecnecio ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) y marcadores fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, y biotina.

55 Pueden detectarse anticuerpos contra el organismo, o contra componentes del mismo, usando, por ejemplo, la técnica bien conocida de ensayo inmunoabsorbente, tal como un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).

60 Por tanto, se desvela un ensayo inmunoabsorbente para detectar anticuerpos asociados con una ERIC, comprendiendo el ensayo: una fase sólida revestida con (a) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, en el que el agente comprende *M. cynos* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento; y opcionalmente uno cualquiera o más de (b) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*; y (c) un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydophila*; y un conjugado marcador detectable con el que se unirán los anticuerpos unidos a la fase sólida.

65

Preferentemente, la fase sólida es un pocillo de microtitulación. Preferentemente además, el conjugado comprende anticuerpos anti-anticuerpos de perro. Preferentemente, el conjugado comprende una enzima, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante. Preferentemente además, el ensayo inmunoabsorbente también comprende un sustrato para la enzima. La descripción incluye un kit de partes que incluye los componentes del ensayo inmunoabsorbente. El kit de partes puede por tanto incluir una fase sólida, tal como una placa de microtitulación, una proteína del organismo u organismos para revestir la fase sólida, un conjugado marcador detectable, tal como un anticuerpo anti-perro, que se unirá a anticuerpos anti-organismo (o componentes del mismo) unidos a la fase sólida. Si el conjugado marcador detectable es una enzima, el kit de partes también puede incluir un sustrato para la enzima. El kit también puede incluir una muestra de control positivo que contenga un anticuerpo que se sabe que reacciona con el antígeno sobre el sustrato sólido, y una muestra de control negativo.

También se desvela un sustrato en fase sólida revestido con uno cualquiera o dos o tres de (a), (b) y (c), como se ha definido anteriormente y en el primer aspecto de la invención. Normalmente, el agente que es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria es uno que también se unirá a un anticuerpo. Normalmente, el agente es una proteína antigénica. Normalmente, la proteína se reviste en placas de microtitulación durante una noche de 4 °C a 37 °C, dependiendo de la estabilidad del antígeno. La proteína no unida se elimina con un tampón de lavado, tal como solución salina tamponada con fosfato o solución salina tamponada con Tris. Las muestras de suero u otras muestras se incuban en la placa, normalmente a 37 °C durante entre 1 y varias horas. El material no unido se elimina con lavado, las placas se incuban con un anticuerpo marcado con enzimas (por ejemplo peroxidasa de rábano picante), tal como anti- IgG o -IgM canino para muestras de suero, o anti-IgA canino para lavados pulmonares, durante 1 a varias horas a 37 °C. El anticuerpo no unido se elimina con lavado y las placas se incuban con un sustrato, tal como OPD, durante aproximadamente 10 min, y la densidad óptica se mide en un fotómetro. Preferentemente, el sustrato sólido es un pocillo de microtitulación.

El listado o discusión de una primera publicación del documento en esta especificación no debería ser necesariamente tomado como un conocimiento en el que el documento es parte de la técnica o es de conocimiento general.

La invención ahora será descrita con más detalle con la ayuda de las siguientes figuras y ejemplos.

Figura 1: Aislamiento de *S. canis* y *S. zooepidemicus* de 209 perros de perrera con el resultado clínico respiratorio (n = número total de perros en cada grupo). Las barras de error representan intervalos de confianza (95 %).

Figura 2: Porcentaje de perros con ERIC, *S. canis* o *S. zooepidemicus* con tiempo en la perrera (n = número total de perros en cada grupo de un total de 209 perros). Las barras de error representan intervalos de confianza (95 %).

Figura 3: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar de *M. cynos* a niveles crecientes de severidad de ERIC.

Figura 4: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar de *M. cynos* después de aumentar la duración de tiempo en la perrera.

Figura 5: secuencia parcial nucleótido 218 (SEC ID NO:1) del gen 23S ARNr de una *Chlamydomphila* aislada de un perro con ERIC (DHB10).

Figura 6: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar de *Chlamydomphila* a niveles crecientes de severidad de ERIC.

Figura 7: secuencias de ARNr 23S parcial (DHB) alineada con ARNr 23S de todas las especies conocidas de *Chlamydia* y *Chlamydomphila* (*Cabor-C. abortus*, *Cpsit-C. psittaci*, *Cfe.-C. felis*, *Ccavi-C. caviae*, *Cpne-C. pneumoniae*, *Cpec-C. pecorum*, *Csuis-C. suis*, *Ctrac-C. trachomatis*, *Wad-Waddlia*, *Sim-Simkania*).

Figura 8: secuencias parciales de nucleótido 218 (SEC ID Nos: 2-8) del gen ARNr 23S de siete aislados adicionales de una especie de *Chlamydomphila* aislada de un perro con ERIC (DHB 2,4, 5, 6, 7, 8 y 9).

Figura 9: Porcentaje de perros con infección traqueal y pulmonar de herpesvirus canino a niveles crecientes de severidad de ERIC.

Ejemplo 1: La asociación de *Streptococcus equi* subespecie *zooepidemicus* con enfermedad respiratoria infecciosa canina.

Resumen

La enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC) es una infección multifactorial que afecta a la mayoría de los perros de perrera a pesar del amplio uso de la vacunación. Las actuales vacunas apuntan a proteger contra los

agentes virales y un simple agente bacteriano, *Bordetella bronchiseptica*. Examinábamos el papel de las especies de estreptococos en ERIC. El aislamiento e identificación del estreptococo en el tracto respiratorio inferior de perros clínicamente sanos y aquéllos con ERIC eran usados para relacionar la presencia de especies específicas de estreptococos con la enfermedad respiratoria. Demostramos que la presencia de *S. equi* sub *species* *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) está asociada al incremento de la severidad de la enfermedad en un población de perros de perrera con ERIC endémica.

Introducción

La ERIC es una infección que afecta a perros de todas las edades y comúnmente ocurre cuando un gran número de perros son caseros junto un cercano confinamiento. La enfermedad tiene una alta morbosidad con la tos seca áspera característica de laringitis en sus etapas tempranas, secreciones nasales y/o oculares, y anorexia y depresión variable, las cuales pueden evolucionar en traqueobronquitis, neumonía e incluso la muerte en la mayoría de los casos. La enfermedad ha sido históricamente considerada como una infección compleja en la que combinó un desafío secuencial con ambos virus (CPIV y CAV-2) y agentes bacterianos que producen un engrandecimiento sinérgico de los resultados clínicos (Appel y Binn, 1987). El agente bacteriano más común detectado durante la enfermedad es *B. bronchiseptica* (McCandlish y col, 1978), pero otras especies como *Pasteurella* sp, *Mycoplasma* sp, y β -hemolítico estreptococo (β hS) han sido asociadas con esta enfermedad (McCandish y col, 1978; Rosendal, 1978; Thrusfield y col, 1991).

Muchos estudios involucrados en el aislamiento bacteriano del tracto respiratorio superior (oral y cavidad nasal) e inferior (tráquea y pulmones) de ambos perros enfermos y sanos mencionan la presencia de β hS (Smith, 1967; McCandlish y col, 1978; McKiernan y col, 1982; Azetaka y Konishi, 1988). Sin embargo, a pesar de la variedad de especies de β hS encontradas en el tracto respiratorio superior de los perros, sólo unas pocas investigaciones están orientadas a las especies de β hS involucradas en las enfermedades de las vías respiratorias inferiores (Garnett y col, 1982; Angus y col, 1997). Aunque especies de β hS en el tracto respiratorio canino fueron anotadas por Biberstein y col, (1980) este estudio descuidó la distinción entre el transporte en tracto respiratorio superior e inferior. Además, incluso aunque el aislamiento era de pacientes hospitalarios veterinarios, se omitió la razón para la derivación y por lo tanto un enlace a condiciones clínicas específicas. El más común β hS en perros, *S. canis*, un Grupo Lancefield G *Streptococcus*, es un normal comensal de la mucosa genital y respiratoria como en la piel (Timoney, 1987; Quinn et al, 1999). *Streptococcus canis* (*S. canis*) ha sido previamente aislado de las amígdalas de 60 a 73 % de los perros sanos (Smith, 1967; Sadatsune and Moreno, 1975; Biberstein y Hirsh, 1999). *S. canis* causa varias infecciones esporádicas y oportunistas en perros, incluyendo la neumonía, septicemia, flemas, otitis, mastitis, piometra, proctitis, síndrome de shock tóxico y fascitis necrotizante (Biberstein y Hirsh, 1999, Quinn y col, 1999).

Además de *S. canis* β hS de otros Grupo Lancefield, tales como A, C, y E, han sido aislados de perros (Biberstein y col, 1980). *S. zooepidemicus*, Grupo Lancefield C, se encuentra como un comensal de las mucosas del tracto respiratorio superior de los mamíferos (Timoney y col, 1988; Quinn y col, 1999). Ello está asociado con diversos síntomas de enfermedades incluyendo enfermedades respiratorias inferiores, neumonía de potrillo y cervicitis en caballos (Chanter, 1997; Biberstein y Hirsh, 1999), neumonía en llamas (Biberstein y Hirsh, 1999), septicemia y artritis en cerdos (Timoney, 1987), mastitis en vacas y cabras (Timoney y col, 1988), septicemia en aves de corral, pericarditis y neumonía en corderos (Timoney, 1987), linfadenitis en conejillos de indias (Quinn y col, 1999) y glomerulonefritis en humanos (Balter y col, 2000). En perros, *S. zooepidemicus* ha estado asociado con infecciones respiratorias, septicemia (Quinn y col, 1999) y neumonía hemorrágica necrótica aguda (Garnett y col, 1982). En este estudio, buscábamos establecer especies de β hS las cuales están presentes en el tracto respiratorio de los perros sanos y en perro con ERIC.

Materiales y Procedimientos

Estudio de población y muestreo.

El principal estudio de población (n=209, lavado alveolar bronquial, LAB) se compone de animales de bien establecidos recogidos de perreras (~600 perros) con una historia endémica de ERIC: en la entrada a la perrera, todos los perros fueron vacunados con KAVAK DA₂ PiP69 (Fort Dodge) una vacuna viva atenuada para el virus del moquillo, CAV-2, CPIV y parvovirus canino y KAVAK L contra Leptospirosis. La presencia de ambos coronavirus canino (CVRC) y *B. Bronchiseptica* ha sido demostrada en perros con ERIC en este centro (Chalker y col. 2003: Erles y col. 2003). Cada semana en esta perrera debía sacrificarse algunos perros por razones de bienestar y de esos perros 2-3 eran seleccionados arbitrariamente para el muestreo. Muestras de LAB fueron tomadas por el siguiente procedimiento de un total de 209 individuos perrunos en un periodo de 2 años de 1999 a 2001. Dentro de las 2 horas de eutanasia, la tráquea fue sujeta justo por encima de la bifurcación para prevenir cualquier contaminación traqueal del pulmón durante el muestreo. Usando un catéter estéril y en un tubo de 50 ml, la solución de Sal Equilrada Hanks fue entonces emplazada en el lóbulo del pulmón izquierdo apical. Este lóbulo del pulmón fue masajeado manualmente durante 30 segundos y el LAB retirado. La eutanasia en perros era graduada por la severidad de los resultados respiratorios clínicos en las siguientes características: (1) signos de no respiración, n=71 (2) Media tos, n=37 (3) Tos y segregación nasal, n=76 (4) Tos y segregación nasal con depresión y/o inapetencia n=9 (5) bronconeumonía supurativa, n=16.

Después del muestreo de LAB, una sección de tejido pulmonar del lóbulo derecho distal fue tomado por análisis histológico. Formalina fijaba (10 % formalina salina) a los bloques de tejido que estaban incrustados en parafina, y hemotoxilina estándar y secciones de eosina teñidas, que eran vistas bajo la luz del microscopio (X40, X100, X400).
5 La presencia o ausencia de neutrófilos intra-alveolar era anotada.

El número total de días en el que cada perro permaneció en la perrera era grabado y el tiempo en la perrera era calculado en semanas. La edad y condición clínica a la entrada de la perrera de cada animal era anotada y el resultado de la composición de la condición clínica se basaba en el estatus nutricional, pelo, comportamiento, apetito
10 y examinación general clínica (temperatura, frecuencia cardiaca y pulmonar) era graduada como sigue: buena (1), pobre (2), muy pobre (3).

Una población adicional perruna fue incluida como un grupo de control que consistía en perros caseros con unos síntomas respiratorios clínicos referidos al diagnóstico bacteriológico de RVC por un periodo de 2 años (1998 a 2000) (n=71, LAB). Muestras del grupo de control fueron recogidas usando técnicas guías endoscópicamente como describió Cocoran (1998). Todas la muestras en el estudio fueron guardadas a 4 °C hasta el test bacteriológico, y el testado fue desarrollado dende de 24 h del muestreo excepto el calculo de CFU por ml que fue desarrollado en LAB helado.
15

20 Aislamiento Bacteriano e Identificación.

Un volumen de 50 µl de LAB fue recubierto en duplicado en Columbia Blood Agar (Oxoid Ltd, Hampshire, UK) con un 5 % de sangre de oveja e incubadas ambas aeróbicamente y anaeróbicamente durante 24 horas a 37 °C. Las colonias de β-hemolíticas fueron identificadas y purificadas en colonias individuales. Las bacterias gram-positiva catalasa-negativa fueron identificadas como streptococci por morfología celular y colonial, y entonces serogrupadas por aglutinación deslizante de cama de látex (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) en Grupo Lancefields. Las aisladas fueron identificadas en especies de nivel de utilización biomédica y acción enzimática usando el kit de identificación manual API20STREP (bioMérieux UK Ltd, Basingtoke, UK).
25

Con el fin de detectar infecciones mixtas, se examinaron 3 colonias de los 12 primeros perros en el estudio por aglutinación deslizante de perlas de látex y API20STREP. Diluciones en serie de LAB en solución salina tamponada con fosfato (Sigma-Aldrich Co. Ltd, Dorset, UK) se sembraron en placas por triplicado, se incubaron como se ha descrito anteriormente y se calcularon las UFC (unidades formadoras de colonias) por ml de LAB. Después el cultivo de βhS se clasificó de la siguiente manera: ninguno (0), <100 UFC por ml (1), 100 a 1000 UFC por ml (2) y > 1000 UFC por ml (3).
30
35

Análisis Estadístico.

Un nivel significativo o probabilidad de un tipo de error I (α) de 0.05 fue asumido en todos los análisis. La presencia de S. zooepidemicus con edad, condición clínica a la entrada de la perrera, semanas en la perrera, la presencia de neutrofilos intra-alveolar y resultados respiratorios clínicos fueron analizados usando Prism (versión 3.0, GraphPad Software Inc, San Diego, USA) software de test estadístico de análisis X². La correlación del crecimiento de la bacteria y resultado respiratorio fue determinado por el uso de resultados principales combinados, analizados con Prism por una dirección ANOVA (no-paramétrico) test. La presencia de S. canis, S. zooepidemicus y enfermedad respiratoria en las muestras de perros de perrera en tiempo de semanas también fue calculada.
40
45

Resultados.

Streptococci β-hemolítica fueron aisladas de ambas poblaciones de objeto de estudio, y el aislamiento de LAB de mascotas caseras fue considerablemente diferente de los perros de perrera (1,4 % perros casero, 23,9 % perrera, X² análisis ***p=0,000). Todas las hS aislados fueron encontrados de ser S. canis o S. zooepidemicus. Las infecciones mixtas con diferentes Grupos Lancefield o especies no fueron encontradas, además todas las placas individuales presentaron colonias de morfología uniforme. Ambas S. canis y S. zooepidemicus fueron aisladas de perros de perrera, mientras que una simple aislada de S. zooepidemicus y no S. canis fueron aisladas de mascotas caseras. S. zooepidemicus fue encontrada para ser la especie predominante hS en los perros de perrera (92 %). El transporte de ambas S. canis y S. zooepidemicus fue examinado en los perros de perrera dentro de cada grado de resultado respiratorio clínico (figura 1). S. canis fue presentado en ambos perros con y sin resultados clínicos, y el aislamiento no incrementó la severidad de la enfermedad. En contraste, los perros sanos eran menos propensos a tener S. zooepidemicus en el tracto respiratorio inferior que los animales enfermos (X² análisis, **p=0,004) y el aislamiento de S. zooepidemicus incrementó dramáticamente con el incremento del resultado clínico respiratorio, de 9,7 % en perros sin síntomas a 87,5 % en perros con bronconeumonía supurativa (X² análisis, ***p=0,000). Los perros con resultados respiratorios superiores eran más propensos a tener un mayor resultado de crecimiento de S. zooepidemicus que los perros clínicamente sanos (análisis ANOVA simple ***p=0,000. Rcuadrado= 0,194, F=22,265). La edad y condición clínica del animal a la entrada de la perrera no tuvo efecto en el aislamiento de S. zooepidemicus (X² análisis, edad p=0,341, condición clínica a la entrada p=0,295).
50
55
60
65 El porcentaje de perros con ERIC en la perrera se incrementó dramáticamente de 21,1 % en la semana 1 a 70,1 %

en la semana 2, y ERIC no decreció en la población hasta después de la cuarta semana (Figura 2). Aunque la diferencia no significativa fue detectada, el número de perros con *S. zooepidemicus* en el pulmón incrementó de 20,6 % en el tiempo de la perrera desde 16,7 % en la semana 1 al 34,4 % en la semana 3 (Figura 2), mientras tanto la tendencia fue vista con *S. canis*.

5 Los análisis histológicos revelaron que los perros con *S. zooepidemicus* eran más probables a tener neutrofilia intra-alveolar que los que no tenían *S. zooepidemicus* (X^2 análisis, $**p=0.006$). En perros con altos resultados bacterianos, supuraciones agudas o neumonías necróticas con moderado a marcado agregación macrófaga era a menudo anotada, similar a los encontrados de Garnett y col, (1982) en perros con *S. zooepidemicus* que indujeron
10 neumonía hemorrágica streptococcal (NHS). Las células no bacterianas eran aparentemente teñidas en secciones H y E.

Discusión

15 En este estudio lo orientamos a las especies de β hs presentes en el tracto respiratorio inferior de los perros caseros y los perros de perrera, con y sin enfermedad respiratoria. Aunque *S. canis* es la predominante β hs del tracto respiratorio en perros (Biberstein y col, 1980) y fue aislado desde el tracto respiratorio inferior de algunos perros de perrera en este estudio, ello no fue asociado con ERIC en los perros de perrera. En contraste, un incremento del aislamiento de *S. zooepidemicus* fue asociado con el aumento de ERIC severo. Los perros con cualquier síntoma
20 respiratorio eran más propensos a tener *S. zooepidemicus* en el tracto respiratorio inferior que los animales sanos en las perrerías y *S. epidemicus* fue encontrado en una baja proporción de las mascotas caseras que en los perros de perrera.

25 *Streptococcus equi* sub species *zooepidemicus* a sido previamente asociada con NHS en perros (Garnett y col, 1982). El síndrome de NHS era una severa infección en la colonia cercana de beagles, en las cuales de repente la muerte era seguida sin resultados clínicos primarios. En la necropsia se encontró abundantes exudaciones hemorrágicas dentro de la tráquea y las ramificaciones bronquiales, con pulmones enrojecidos oscuros difusivos. Además, había hemorragías equimóticas de un rango de otros tejidos. La enfermedad era reproducida por
30 inoculación intra-traqueal con *S. zooepidemicus* en un perro. Lo interesante de este estudio, perros con altos resultados de crecimiento de *S. zooepidemicus* eran más probables a neutrofilia intra-alveolar y comparten las características histológicas de los pulmones descritos en Garnett y col, (1982) en NHS que aquellos perros con bajos resultados en crecimiento.

35 ERIC ha sido históricamente considerada como una enfermedad compleja, involucrando ambos agentes bacterianos y virales. De hecho, muchos otros agentes han sido descritos en esta población de perro de perrera, incluyendo CVRC. (Erls y col, 2003) y *B. bronchiseptica* (Chalker y col, 2003). Aunque el potencial patogénico de CVRC no ha sido clarificado todavía, dato de Erls y col (2003) muestra que CVRC predomina en aquellos perros con enfermedad respiratoria media (resultado 2) y similarmente a Chalker y col (2003) encontrado en perros con *B. bronchiseptica* predomina en aquellos perros con enfermedad moderada (resultado 3).

40 Encontramos que *Streptococcus zooepidemicus* está asociado más comúnmente con sólo los más severos casos de ERIC (resultado 4-5) indicando que podría actuar como un secundario invasor. De hecho, especies de β hs han sido previamente descritas como invasores secundarios en el complejo ERIC (McCandlish y col, 1978). Sin embargo, ello todavía no es conocido si *S. zooepidemicus* juega un papel importante en la enfermedad respiratoria en estos
45 animales o simplemente invade el tracto respiratorio provocando daño por otros patógenos. Las pruebas epidemiológicas sugieren que en los caballos, *S. zooepidemicus* podría ser un patógeno primario en la enfermedad respiratoria (Word y col, 1993; Cjanter, 1997) pero puede ser considerada para ser un agente oportunístico (Walker y Timoney 1998; Anzai y col, 2000). Incluso si *S. zooepidemicus* no es una causa primaria de ERIC en estos perros, el rango de gran aislamiento de perros con bronconeumonía supurativa (87,5 %) apoya la hipótesis que *S. zooepidemicus* es responsable de la mayoría de los signos clínicos que se ven en esta perrera. El bajo aislamiento de mascotas caseras (1,4 %) con enfermedad respiratoria, indica que este agente podría estar en común con una
50 infección respiratoria y podría ser un problema particular para esta perrera. Aunque y previamente la perrera no fue tomada en consideración es más probable que algunos perros domésticos en este estudio han estado en la perrera alguna vez. El papel jugado por *S. zooepidemicus* en otros casos de ERIC en perros de perrera, no ha sido establecido.

55 El aislamiento de *S. zooepidemicus* de estos perros se incrementa con el tiempo en la perrera, indicando que los pulmones de estos perros llegan a estar infectados con estas bacterias. Tal infección podría ocurrir de infecciones subclínicas del tracto respiratorio superior o de una cepa simple patogénica. Un sistema de tipificación PCR para el gen de la proteína SzP variable tipo M, permite la separación de 15 conocidos sero-tipos de *S. zooepidemicus* en cinco grupos definidos, HV1-5 (Walter y Timoney, 1998). Análisis con estos sistemas de mecanografiado de Anzai y col, (2000) encontró que las variantes clonales simples de *S. zooepidemicus* fueron encontradas en el pulmón de
60 neumonía de caballo mientras que los diferentes tipos se encuentran en amígdalas de los caballos sanos. Sería interesante para los sub-tipos de *S. zooepidemicus* aislar los iniciadores involucrados de ERIC para determinar si una variante simple clonal está presente en la población enferma, y también para examinar la relación, si la hay, que los aislados de *S. zooepidemicus* canina tienen que causar la enfermedad respiratoria en caballos o en otros

animales. La neumonía asociada de *S. zooepidemicus* se da en caballos de todas las edades y la neumonía acusada hemorrágica en caballos viejos, que son estresados por el transporte (Anzai y col, 2000). En este brote de ERIC en perros jóvenes y las condiciones clínicas pobres a la entrada de la perrera eran susceptibles a la infección con *S. zooepidemicus* como en los perros viejos y estos estaban sanos a la entrada.

En esta perrera, la terapia antibiótica es dada para un rango de infecciones, y el tratamiento no es rutinariamente dada a perros con ERIC excepto en casos de bronconeumonía severa. Es posible que el tratamiento pudiera estar influenciado por el espectro de la bacteria anotado en este estudio. Sin embargo la examinación de brotes naturales de enfermedades respiratorias puede proporcionar información valiosa que no es obtenida de otras maneras.

ERIC es conocida para ser una enfermedad multi-factorial que incluye a diversos agentes como CAV-2, CPIV, B. bronchiseptica y *Mycoplasma* spp. En esta perrera en la cual un gran número de perros de diversas localidades son traídos juntos y domesticados, muchos patógenos están presentes y la severidad de esta enfermedad podría reflejar esto.

Ejemplo 2: La asociación de *Mycoplasma cynos* con la enfermedad infecciosa respiratoria canina.

La presencia de *M. cynos* fue investigada por el cultivo del organismo e identificación por análisis PCR. En una encuesta de 184 perros de perrera, encontramos que el porcentaje de perros con *M. cynos* en la traquea o pulmón se incrementa con signos de enfermedad respiratoria del 10 % en perros sanos al 31 % en perros enfermos (figura 3).

También anotamos que la enfermedad respiratoria se incrementa con el tiempo en la perrera y durante la primera semana en los perros de perrera no se detectó *M. cynos* en la traquea, mientras que en la segunda semana el 24 % de 184 perros de la población estaba siendo infectada con esta bacteria. Un pequeño pero similar aumento fue también visto por la colonización del pulmón (del 15 % al 23 %) (vea figura 4).

Ejemplo 3: La asociación de *Chlamydia* con la enfermedad infecciosa canina respiratoria.

Reconocimos 210 perros por análisis PCR para la presencia de *Chlamydia*. Un fragmento de par de bases (pb) 218 del gen 23S ARNr fue amplificado des la *Chlamydia* por el siguiente PCR. Las condiciones de reacción, 95 °C 5min (x 1 ciclo), 95 °C 30 segundos, 50 °C 30 segundos, 72 °C 1 minuto (x 40 ciclos) y 72 °C 5 min. La reacción de PCR mezcla 50 µl del total incluido 5,0 µl 10x buffer libre de magnesio (Promega), 1,5 mM MgCl₂ (Promega), 0.5 µl (0,5 unidades) Taq ADN polimerasa (Promega), 0.2 mM nucleótido PCR mezcla (Promega), 0,025 µg seguido del iniciador C1 (5'- GATGCCTTGGCATTGATAGGCGATGAAG GA-3', SEC ID NO: 9) y el iniciador contrario C2 (5'- TGGCTCATCATGCAAAAGGCA- 3', SEC ID NO: 10), 40 µl agua y 2 µl de tejido de muestra de ADN.

Un producto PCR obtenido de 8 perros fue confirmado como una *Chlamydia* por análisis de secuencia y comparación del producto PCR para todas las posibles secuencias en Genbank por análisis Fasta. La secuencia parcial de gen 23S ARNr de tal secuencia (DHBC10) es mostrada en la figura 5 (SEC ID NO: 1). Esta secuencia pb 218 es 99,08 % idéntica que la misma región en *Chlamydia abortus* y 98,6 % idéntica a *Chlamydia psittaci* y 96,3 % idéntica a *Chlamydia felis* y en los análisis filogenéticos preeliminarios (procedimiento clustal con Megalign) la mayoría de las secuencias del grupo en un clade distinto (figura 7). Las secuencias parciales 23S ARNr de otras siete aisladas *Chlamydia* son mostradas en la figura 8 (SEC ID Nos: 2-8).

En esta estadística encontramos un incremento en la detección de *Chlamydia* con un incremento en la severidad de la enfermedad respiratoria en la traquea y pulmón. Un ligero incremento de la detección de 10 % fue encontrado en las muestras de tráqueas (del 25 % al 34 %). Una diferencia más dramática fue encontrada en la detección de *Chlamydia* en el pulmón, con un incremento del 0 % en perros sanos a 37,5 % en perros con ERIC (figura 6). Además, un incremento en el número total de perros examinados positivos por PCR para *Chlamydia* desde el 25 % en perros sanos al 50 % en perros con enfermedad severa fue anotada (Figura 6).

Ejemplo 4: La asociación de herpesvirus canino con enfermedad respiratoria infecciosa canina.

Encontramos un incremento en la frecuencia de herpesvirus canino en perros con síntomas severos respiratorios (figura 9). Cuando el anticuerpo monitorizado responde a CHV mas de un periodo de un año, los perros de las perreras con frecuentes brotes de enfermedad respiratoria mostraron seroconversiones de CHV más frecuentemente (58,3 %) que los perros de perreras similares sin los brotes (8,3 %).

Referencias

Angus, J.C., Jang, S.S., Hirsh. D.C., (1997). Estudio Microbiológico de aspiraciones transtraqueales de perros con enfermedad respiratoria del tracto inferior conjeturado: 264 casos (1989-1995). J. Am. Vet. Med. Assoc. 210, 55-58.

Anzai, T., Walker, J.A., Blair, M.B., Chambers, T.M., Timoney, J.F., (2000). Comparación de fenotipos de *Streptococcus zooepidemicus* aislados de amígdalas de caballos sanos y especímenes obtenidos de potrillos y

- burros con neumonía Am. J. Vet. Res. 61, 162-166.
- Appel MJ, Percy DH. virus canino paragripal de tipo SV-5 (1970) J Am Vet Med Assoc. 1970 Jun 15; 156(12):1778-81.
- 5 Appel, M., Binn, L.N., 1987. Traqueobronquitis Canina Infecciosa, artículo de revista: Tos Perruna. In: Appel M. (Ed.), Virus Infections of Carnivores. Elsevier. Oxford. pp.201-211.
- 10 Arizmendi F, Grimes JE, Relford RL. (1992). Aislamiento de Chlamydia psittaci de la efusión pleural en un perro. J Vet Diagn Invest. 4(4): 460-3.
- Azetaka, M., Konishi, S., (1988). Tos perruna compleja: confirmación y análisis del brote en Japón. Jap. J. Vet. Sci. 50, 851-858.
- 15 Balter, S., Benin, A., Pinto, S.W.L., Teixeira, L.M., Alvim, G.G., Luna, E., Jackson, D., LaClaire, L., Elliot, Alvim, G.G., Luna, E., Jackson, D., LaClaire, L., Elliot,. Nefritis Epidemica in Nova Serrana, Brazil. Lancet. 355, 1776-1780.
- 20 Barile, M. F. (1985) Inmunización contra infecciones de micoplasma p 451-452. In S. Razin and M.F. Barile (Ed.). Las Mycoplasmas, vol 4. Patogeneidad de Mycoplasma. Academic Press, Inc, Orlando, Florida.
- Barile M. F. y col., (1985). Actual estatus en los controles de enfermedades mycoplasmáticas en el hombre, animales, plantas e insectos. Bull. Inst. Pasteur. 83: 339-373.
- 25 Bemis, D.A., Carmichael, L.E., and Appel, M.J. (1977a). Enfermedad respiratoria desarrollada de forma natural en la perrera causada por Bordetella bronchiseptica. Cornell Vet 67, 282-93.
- Bemis DA, Greisen HA, and Appel MJ. (1977b). Patogénesis de bordetellosis canina. J Infect Dis 135:753-762.
- 30 Biberstein, E.L., Brown, C., Smith, T., (1980). Serogrupos y Biostipos entre beta-hemolitico streptococci de origen canino, J. Clin. Microbiol. 11, 558-561.
- Biberstein, E.L., Hirsh, D.C., (1999). Streptococci en: Hirsh, D.C., Zee, Y.C., (Eds.) Microbiología Veterinaria. Blackwell Science. Oxford. pp 120-126.
- 35 Binn, L. N., Eddy, G. A., Lazar, E. C., Helms, J., and Murnane, T. (1967). Virus recuperados del laboratorio de perros con enfermedad respiratoria. Proc Soc Exp Biol Med 126, 140-5, Chalker VJ, Toomey C, Opperman S, Brooks HW, Ibuoye MA, Brownlie J, Rycroft AN. Enfermedad respiratoria en perros de perrera: Respuesta serológica a la Bordetella bronchiseptica Lipopolisacarida no correlacionada con aislamiento bacterial o síntomas respiratorios clínicos. Clin Diagn Lab Immunol. 10 (3): 352-6. 2003,
- 40 Chanter, N., (1997) Streptococci y enterococci como animales patógenos. J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl. 83,100S-109S.
- 45 Cocoran, B. (1998). Tecnicas de colección citológicas en: Luis Fuentes, V. Swift, S., (Eds.), Manual de medicina y cirugía cardiorespiratoria de pequeños animales. British Small Anim. Vet. Assoc. Cheltenham. pp. 75-79.
- Ditchfield, J., Macpherson, L. W., and Zbitnew, A. (1962). Asociación de adenovirus canina (Toronto A 26/61) con un brote de laringotraqueitis ("tos de perrera"). Can. Vet. Jour. 3, 23 8-247
- 50 Ellis JA, Haines DM, West KH, Burr JH, Dayton A, Townsend HG, Kanara EW, Konoby C, Crichlow A, Martin K, Headrick G. (2001) Efecto de vacunación en infección experimental con Bordetella bronchiseptica in dogs. J Am Vet Med Assoc. 218(3): 367-75.2001
- 55 Erles, K., Toomey, C., Brooks, H.W., Brownlie, J. (2003). Detección de un grupo 2 de coronavirus en perros con enfermedad respiratoria infecciosa canina. Virology. In press.
- Farrow JA, y col. (1984). "Estudios Taxonomicos de Streptococci de grupos serologicos C, G and L y Posiblemente relacionado con taxa". Syst. Appl. Microbiol. 5: 483-493.
- 60 Fraser G, Norval J, Withers AR, Gregor WW. (1985) Un caso de historia de psittacosis en el perro. Vet Rec. 1969 85(3): 54-8.
- 65 Fukushi H, Ogawa H, Minamoto N, Hashimoto A, Yagami K, Tamura H, Shimakura S, Hirai K. (1985)

- Vigilancia Seroepidemiologica de Chlamydia psittaci en gatos y perro en Japón. Vet Rec. 117(19): 503-4.
- Garnett, N.L., Eydeloth, R.S., Swindle, M.M., Vonderfecht, S.L., Strandberg, J.D., Luzarraga, M.B., (1982). Neumonía Hemorrágica streptococcal en los actuales procedimientos de búseuda en perros. J. Am. Vet. Med Assoc. 181, 1371-1374.
- Gresham AC, Dixon CE, Bevan BJ. (1996) Brote Domiciliario de psittacosis en perros con potencial infección zoonótica. Vet Rec. 138(25):622-3.
- Jang SS, Ling GV, Yamamoto R, Wolf AM. (1984) Mycoplasma como causa de infección del tracto urinario canino. J Am Vet Med Assoc 185(1):45-7
- Karpas, A., King, N.W., Garcia, F.G., Calvo, F., and Cross, R.E. (1968a). traqueobronquitis canina: aislamiento y caracterización de agente con reproducción experimental de la enfermedad. Proc Soc Exp Biol Med, 127, 45-52.
- Karpas A, Garcia FG, Calvo F, Cross RE. (1968b) Producción Experimental de traqueobronquitis canina (tos perruna) con herpesvirus canino aislado en perros. Am J Vet Res. 29(6):1251-7.
- Keil, D.J., and Fenwick, B. (1998). Papel de Bordetella bronchiseptica en traqueobronquitis infecciosa en perros. J Am Vet Med Assoc. 15, 200-7.
- Lambrechts N, Picard J, Tustin RC. (1999) Chlamydia-inducida septic polyarthritis en un perro. J. S Afr Vet Assoc. 70(1):40-2).
- Lou, T.Y., and Wenner, H.A. (1963). Infección Natural y experiemetal de perros con reovirus, tipo1: patogenicidad de la cepa de otros animales. Am.J.Hyg. 77,293-304.
- McCandlish, I.A.P., Thompson, H., Cornwell, H.J.C., Wright, N.G., 1978. Un estudio de perros con tos de las perreras. Vet. Rec. 102, 298-301.
- McKiernan, B.C., Smith, A.R., Kissil, M., 1982. Bacterias aisladas de la traquea inferior de los perros clinicamente sanos. J. Am. Anim. Hospl. Assoc. 20, 139-142.
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R., (Eds.), 1999. Microbiología Clínica Veterinaria. Mosby. pp.129-130.
- Randolph JF, Moise NS, Scarlett JM, Shin SJ, Blue JT, Bookbinder PR. (1993). Frecuencia de recuperación mycoplasmal y ureaplasma recuperados de lavavos traqueobronquiales y frecuencia de recuperación micoplasmal de frotis faringuela de especimenes en perros con o sin enfermedad pulmнар. Am J Vet Res. Mar; 54 (3):387-91.
- Rosendal, S. (1972). Acta Vet. Scand. 13: 137.
- Rosendal & Vinther (1977). Experimental neumonía mycoplasmal en perros: microscopía electrónica de tejido infectado. Acta Pathol Microbiol Scand [B] 85B. (6):462-5.
- Rosendal, S. (1978). Mycoplasmas Caninos: Patogeneidad de mycoplasmas asociados con neumonía de moquillo. J. Infect. Dis. 138(2), 203-210.
- Sadatsune, T., Moreno, G., 1975. Contribución al estudio de b-hemolitica streptococci aislada de perros. Arq. Inst. Biol. Sao. Paulo. 42, 257-264.
- Sako T, Takahashi T, Takehana K, Uchida E, Nakade T, Umemura T, Taniyama H. (2002) Infección Chlamydial en lesiones arterosclerosis en canes. Arteriosclerosis. 162(2):253-9.
- Smith J.E., 1967. La bacteria aerobica de la nariz y amigdalas en perros sanos. J. Comp. Path. 71,428-433.
- Storz, J. (1988) Microbiologia de Chlamydia. p. 168 Ed A. L. Barron, Boca Raton, CRC Press.
- Swango LJ, Wooding WL Jr, Binn LN. 1970. Una comparación de la patogénesis y antigenicidad del virus de hepatitis infecciosa caninas y la cepa de virus A26-61 (Toronto). J Am Vet Med Assoc. 1970 Jun 15; 156(12):1687-96.

- Thompson H, McCandlish IAP, Wright NG: (1976). Enfermedad respiratoria experimental en perros debido a Bordetella bronchiseptica. Res Vet Sci 20: 16-23.
- 5 Thrusfield, M.V., Aitken, C.G.G., Murihead, RH., (1991). Un campo de investigación de tos de perrera, periodo de incubación y signos clínicos. J. Small Anim. Pract. 32:215-220.
- Timoney, J.F. (1987). The Streptococci. In: Gyles, C.L., Thoen C.O., (Eds.) Patogenesis de infecciones bacterial en animales. Iowa State University Press. pp. 12-13.
- 10 Timoney, J.F., Gillespie, J.H., Scott, F.W., Barlough, J.E., (Eds), 1988. El gen Streptococcus. en: Microbiología y enfermedades infecciosa de animales domésticos de Hagan y Bruner. Comstock Publishing Associates, London. pp. 181-187.
- 15 Ural O, Tuncer I, Dikici N, & Aridogan B. (2003). Meningitis de Streptococcus zooepidemicus y bacteraemia. Scand J Infect Dis. 35(3): 206-207.
- Walker, J.A., Timoney, J.F., (1998). Bases Moleculares de variación en proteínas Szp en protección de Streptococcus zooepidemicus. Am. J. Vet. Res. 59, 1129-1133.
- 20 Walker RL & Runyan CA (2003). Identificación de variaciones de proteínas de Szp de Identification of Streptococcus equi subspecies zooepidemicus y la relación entre las proteínas variantes y los signos de infección en caballos. Am J Vet Res. 64(8): 976-81.
- 25 Werth D, Schmeer N, Muller HP, Karo M, Krauss H. (1987). Demostración de anticuerpos contra of Chlamydia psittaci y Coxiella burnetii en perros y gatos: comparación de la enzima inmunoensayo, técnica immunoperoxidas, test de fijación de complemento y test de precipitación de gel agar Zentralbl Veterinarmed B. 34(3): 165-76.
- 30 Wood, J.L.N., Burrell, M.H., Roberts, C.A., Chanter, N., Shaw, Y., (1993). Streptococci y Pasteurella spp. Asociada con la enfermeda de tracto respiratorio inferior equino. Equine Vet. J. 25, 314-318.
- Young S, Storz J, Maierhofer CA. (1972) Características patogénicas de infección experiemntal inducida chlamydial en perros. Am J Vet Res. 33(2): 377-83.

35 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> THE ROYAL VETERINARY COLLEGE
- 40 <120> COMPOSICIÓN DE VACUNA PARA VACUNAR A LOS PERROS CONTRA LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA INFECCIOSA CANINA
- <130> RVCBV/P30948EPdiv1
- 45 <150> EP 04743211.7
<151> 01-07-2004
- <150> PCT/GB2004/002865
<151> 01-07-2004
- 50 <150> GB 0315323.6
<151> 01-07-2003
- <160> 10
- 55 <170> SeqWin99
- <210> 1
<211> 218
<212> ADN
- 60 <213> Desconocido
- <220>
<223> Secuencia parcial del gen 23S ARNr de Chlamydoghila aislada de perro con enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC)
- 65 <400> 1

ES 2 432 175 T3

```

agtggctctcc ccagattcag actaggtttc acgtgcctag ccctactcag gtatcgaata 60
gagtcctcttg ttttttcgtc tacgggacta tcaccctgta tcgttctact ttccagaagt 120
attcgactaa aacttaagat cccatggtat cgaccctaca accccacatt aaaaatgtgg 180
tttggctcttc tcccccttcg ctcgccgcta cacagggga 218

```

5 <210> 2
 <211> 221
 <212> ADN
 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> Secuencia parcial del gen 23S ARNr de Chlamydomytila aislada de perro con ERIC
 <400> 2

```

gacagtggtc tccccagatt cavactaggt ttcacgtgtc tagccctact caggtatcga 60
atagagtctc ttgttttttc gtctacggga ctatcaccct gtatcgttct actttccaga 120
agtattcgac taaaacttaa gatcccatgt tategaccct acaacccac attaaaaatg 180
tggtttggtc ttctcccctt tcgctcggcg ctacacaggg a 221

```

15 <210> 3
 <211> 224
 <212> ADN
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> Secuencia parcial del gen 23S ARNr de Chlamydomytila aislada de perro con ERIC
 <400> 3

```

tgagagtggg ctccccagat tcagactagg tttcacgtgt cttagccctac tcaggtatcg 60
aatagagtct cttgtttttt cgtctacggg actaacaccc tgtatcgttc tactttccag 120
aagtattcga ctaaaactta agatcccatg ttatcgaccc tacaacccca cattaaaaat 180
gtggtttggg cttctcccct tttcgctcggk ccgytatcac aggg 224

```

25 <210> 4
 <211> 221
 <212> ADN
 <213> Desconocido

30 <220>
 <223> Secuencia parcial del gen 23S ARNr de Chlamydomytila aislada de perro con ERIC
 35 <400> 4

```

gadagtggtc tccccagatt cadactaggt ttcacgtgtc tagccctact caggtatcga 60
atagagtctc ttgttttttc gtctacggga ctatcaccct gtatcgttct actttycaga 120
agtattcgac taawwcttaa gatcccatgt tategaccct acaacccac attwwwatg 180
tggtttggtc ttctcccctt tygctcggcg ctacacaggg a 221

```

40 <210> 5
 <211> 217
 <212> ADN
 <213> Desconocido

45 <220>
 <223> Secuencia parcial del gen 23S ARNr de Chlamydomytila aislada de perro con ERIC
 <400> 5

ES 2 432 175 T3

```

tgagagtggg ctccccagat tcagactagg tktcacgtgt ctagccctac tcaggtatcg 60
aatagagtct cttgtttttt cgtctacggg actatcaccc tgtatcgttc tactttccca 120
gaagtattcg actaaaahct taagatcccc atgttatcga ccctacaacc cccacatdaa 180
aaatgtgggt tggctctctc ccctttcgct cgccgct 217

```

5 <210> 6
 <211> 221
 <212> ADN
 <213> Desconocido

10 <220>
 <223> Secuencia parcial del gen 23S ARNr de Chlamydomytila aislada de perro con ERIC
 <400> 6

```

gabagtgggc tccccagatt cagactaggt ttcacgtgtc tagccctact caggtatcga 60
atagagtctc ttgttttttc gtctacggga ctatcaccc gtatcgttct actttccaga 120
agtattcgac taaaacttaa gatccccatgt tatcgaccct acaacccccc attaaaaaatg 180
tggtttgggc ttctccccct tcgctcgccg ctactcaggg a 221

```

15 <210> 7
 <211> 220
 <212> ADN
 <213> Desconocido

20 <220>
 <223> Secuencia parcial del gen 23S ARNr de Chlamydomytila aislada de perro con ERIC
 <400> 7

```

tgagagtggg ctccccagat tcagtcaaaa tatkacgtgt tccgacctac tcaggatact 60
attagtatta ttgagaatbt taattacagg agtatcacct tctatgctct agtttccaac 120
taattcatct attctcttta attacacatt atagtcctac aacccccmaa tgcaagcatt 180
gggtttgtcc taatcccagt tcgctcgccg ctacacaggg 220

```

25 <210> 8
 <211> 220
 <212> ADN
 <213> Desconocido

30 <220>
 <223> Secuencia parcial del gen 23S ARNr de Chlamydomytila aislada de perro con ERIC
 <220> N
 <222> 174
 <223> N puede ser A, C, G o T

35 <400> 8
 40 <210> 9
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

```

tgagagtggg ctccccagat tcagactagg tttcacgtgt ctagccctac tcaggtatcg 60
aatagagtct cttgtttttt tgtctacggg actatcaccc tgtatcgttc tactttccag 120
aagtattcga ctaaaactta agatccccatg ttatcgacc tacaacccca catnaaaaaat 180
gtggtttggg cttctccccct ttcgctcgcc gctacacagg 220

```

45 <220>
 <223> Cebador PCR

50 <400> 9
 gatgcctgg cattgatagg cgatgaag 28

ES 2 432 175 T3

<210> 10
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia artificial
5
<220>
<223> Cebador PCR
10 <400> 10
tggctcatca tgcaaaaggc a 21

REIVINDICACIONES

1. Una composición de vacuna adecuada para vacunar a perros que comprende un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*), en la que dicho agente comprende *M. cynos* inactivada o atenuada, que adicionalmente comprende uno o más de:
- 5 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *Streptococcus equi subespecie zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*), en donde dicho agente comprende *S. zooepidemicus* inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico de *S. zooepidemicus*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento;
- 10 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra el coronavirus respiratorio canino (CVRC), en donde dicho agente comprende el CVRC inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunogénico;
- un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra el virus paragripal canino (CPIV), en donde dicho agente comprende el CPIV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunogénico;
- 15 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra el adenovirus canino de tipo 2 (CAV-2), en el donde agente comprende el CAV-2 inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunogénico;
- un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra el herpesvirus canino (CHV), en donde dicho agente comprende el CHV inactivado o atenuado, o un fragmento inmunogénico del mismo, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunogénico;
- 20 y
un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *Bordetella bronchiseptica* (*B. bronchiseptica*), en donde dicho agente comprende *B. bronchiseptica* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de la misma, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento inmunogénico.
- 25
2. Una composición de vacuna de acuerdo con la reivindicación 1 en la que dicho agente comprende *M. cynos* inactivado.
3. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptables.
- 30
4. Una composición de vacuna de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3 en la que el fragmento inmunogénico del CVRC comprende la proteína Spike o la proteína hemaglutinina esterasa (HE), o una parte inmunogénica de la proteína Spike o de la HE.
- 35
5. Uso de un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, en el que dicho agente comprende *M. cynos* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento, en la preparación de un medicamento para la profilaxis o el tratamiento de una enfermedad respiratoria infecciosa canina (ERIC).
- 40
6. Uso de un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, como se define en la reivindicación 5, en la preparación de un medicamento para estimular en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*.
- 45
7. Uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6 en la que dicho agente comprende *M. cynos* inactivada o atenuada.
8. Uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 5-7 en el que el medicamento comprende adicionalmente cualquiera de uno o más de:
- 50 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*;
un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydophila*, en donde dicho agente comprende:
- 55 *Chlamydophila abortus* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *Chlamydophila abortus*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento,
Chlamydophila psittaci inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *Chlamydophila psittaci*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento, o
Chlamydophila felis inactivada o atenuada o un fragmento inmunogénico de *Chlamydophila felis* o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento;
- 60 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
- 65 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*, como se define en las reivindicaciones 1, 2 y 4.

9. Una composición que comprende un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, como se define en la reivindicación 5, para su uso como medicamento veterinario canino.

5 10. Una composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 9 que adicionalmente comprende cualquiera de uno o más de:

un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*;
 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra una *Chlamydoghila*;
 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
 10 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*,
 como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2, 4 u 8.

15 11. Un kit de partes para una composición de vacuna, que comprende:

un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, como se define en la reivindicación 5; y cualquiera de uno o más de:

20 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*;
 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
 25 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*,
 como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 y 4; y

opcionalmente, un vehículo, diluyente o adyuvante farmacéuticamente aceptables.

30 12. Uso de anticuerpos que se unen específicamente a *M. cynos* en la preparación de un medicamento para inmunizar de manera pasiva a un perro contra una ERIC o para tratar una ERIC en un perro.

35 13. Uso de acuerdo con la reivindicación 12, en la que el medicamento comprende adicionalmente anticuerpos que se unen específicamente a cualquiera de uno o más de CVRC, CPIV, CAV-2, CHV y *B. bronchiseptica*.

14. Una composición de vacuna que comprende:

40 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos* como se define en la reivindicación 5; y
 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC como se define en la reivindicación 1 o 4.

45 15. Un procedimiento para determinar si un perro tiene, o es susceptible a, una ERIC, comprendiendo el procedimiento la identificación de *M. cynos*, o de un anticuerpo contra *M. cynos*, en una muestra adecuada obtenida del perro.

50 16. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15 en el que *M. cynos* se identifica usando un anticuerpo o usando un ácido nucleico.

17. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15 en el que el anticuerpo anti-*M. cynos* se detecta usando *M. cynos* o una parte antigénica del mismo.

55 18. Un procedimiento de acuerdo con la reivindicación 15 en el que la muestra es una muestra que contiene anticuerpos, tal como suero, saliva o un lavado traqueal o bronquiolar.

19. Un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *M. cynos*, en donde dicho agente comprende *M. cynos* inactivada o atenuada, o un fragmento inmunogénico de *M. cynos*, o un ácido nucleico que codifica dicho fragmento, para su uso en la profilaxis o el tratamiento de una ERIC.

60 20. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 19 en el que dicho agente comprende *M. cynos* inactivada.

65 21. Una composición para su uso en la profilaxis o tratamiento de una ERIC que comprende un agente de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, en donde la composición para su uso comprende adicionalmente cualquiera de uno o más de:

- un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *S. zooepidemicus*;
 - un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CVRC;
 - un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CPIV;
 - un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CAV-2;
 - 5 un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra CHV; y
 - un agente capaz de suscitar en un perro una respuesta inmunitaria contra *B. bronchiseptica*,
- como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1, 2 o 4.

FIGURA 1

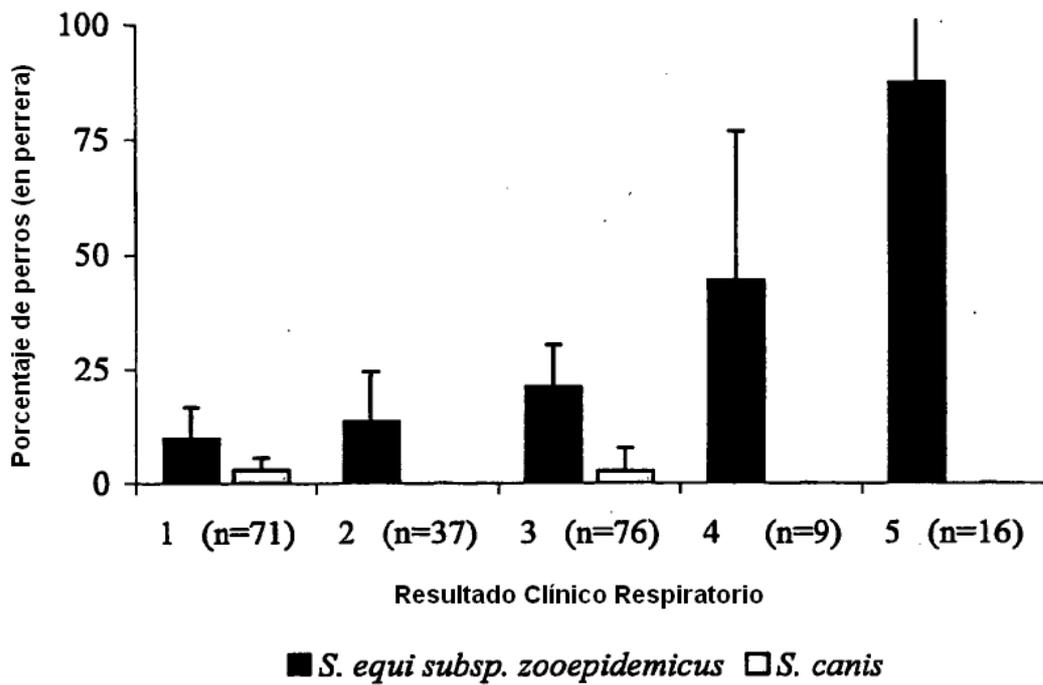


FIGURA 2

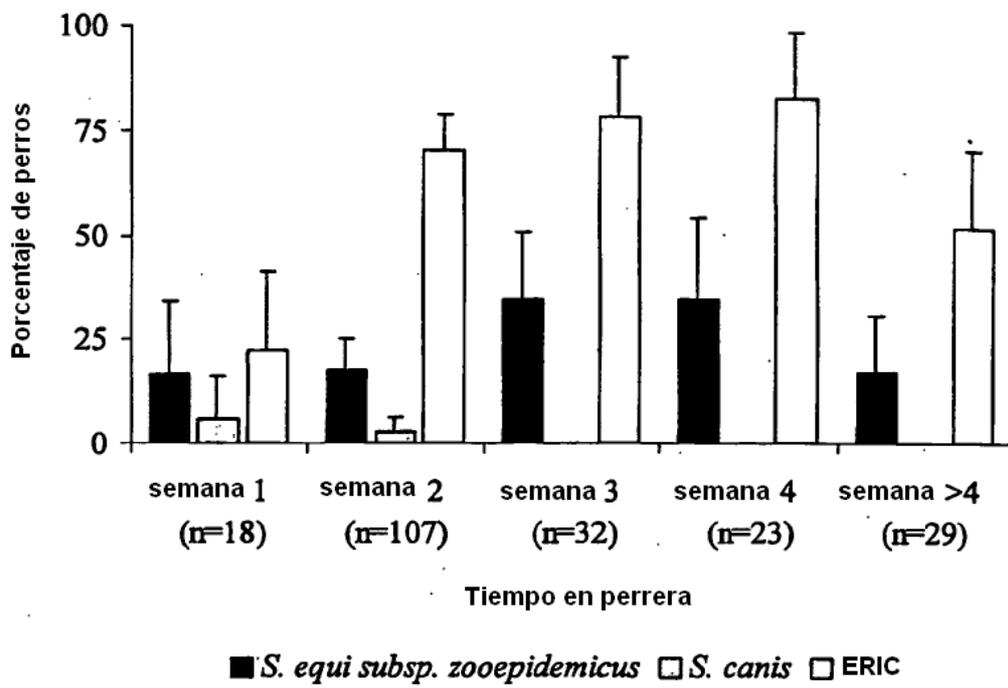


FIGURA 3

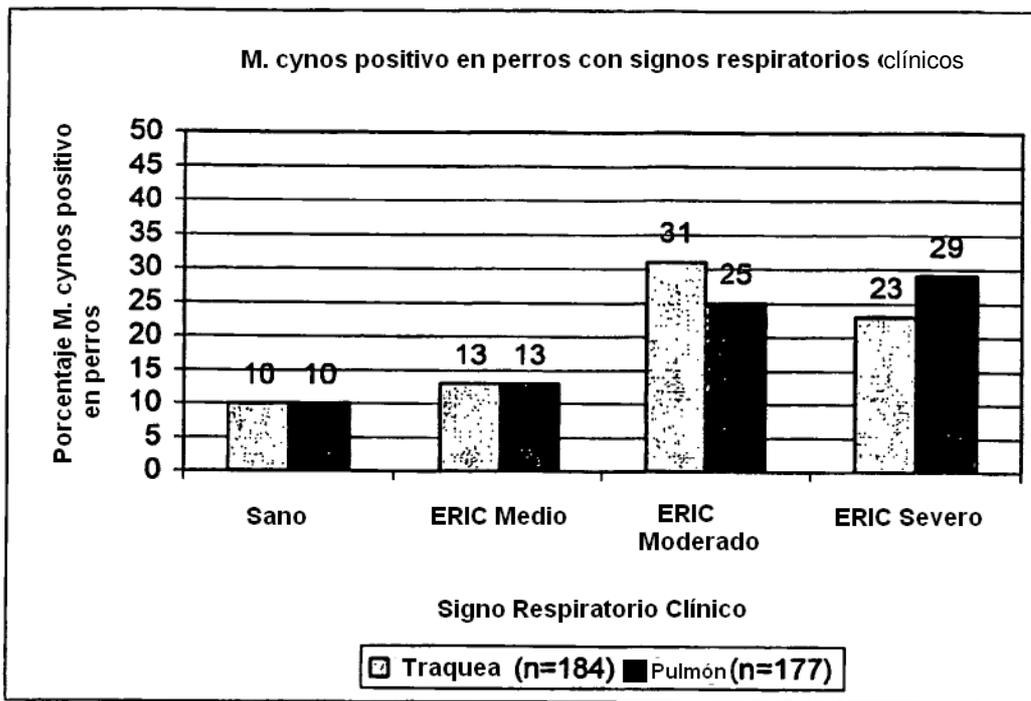


FIGURA 4

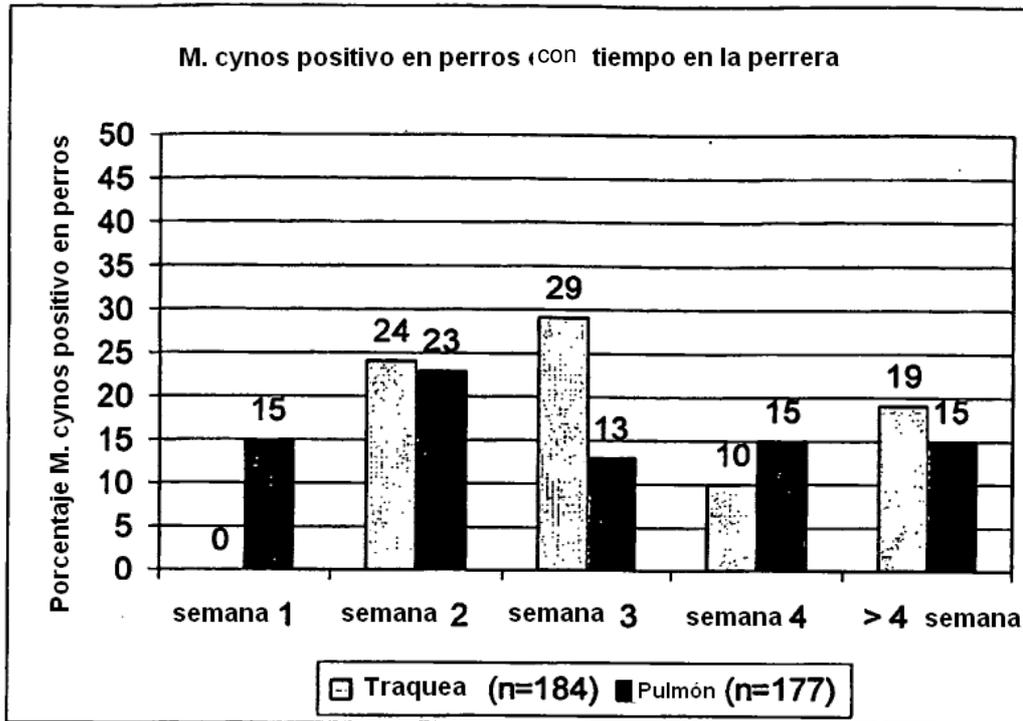


FIGURA 5

AGTGGTCTCC CCAGATTCAG ACTAGGTTTC ACGTGCCTAG CCCTACTCAG
GTATCGAATA GAGTCTCTTG TTTTTTCGTC TACGGGACTA TCACCCTGTA
TCGTTCTACT TTCCAGAAGT ATTCGACTAA AACTTAAGAT CCCATGTTAT
CGACCCTACA ACCCCACATT AAAAATGTGG TTTGGTCTTC TCCCCTTTCG
CTCGCCGCTA CACAGGGA (SEC ID NO: 1)

FIGURA 6

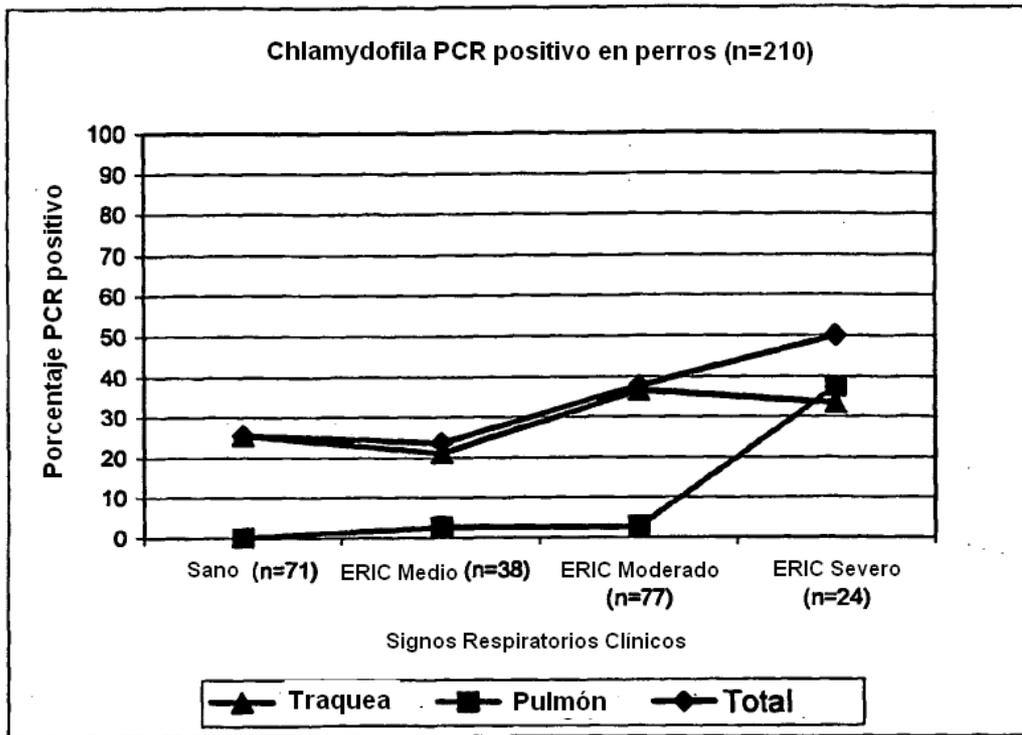


FIGURA 7

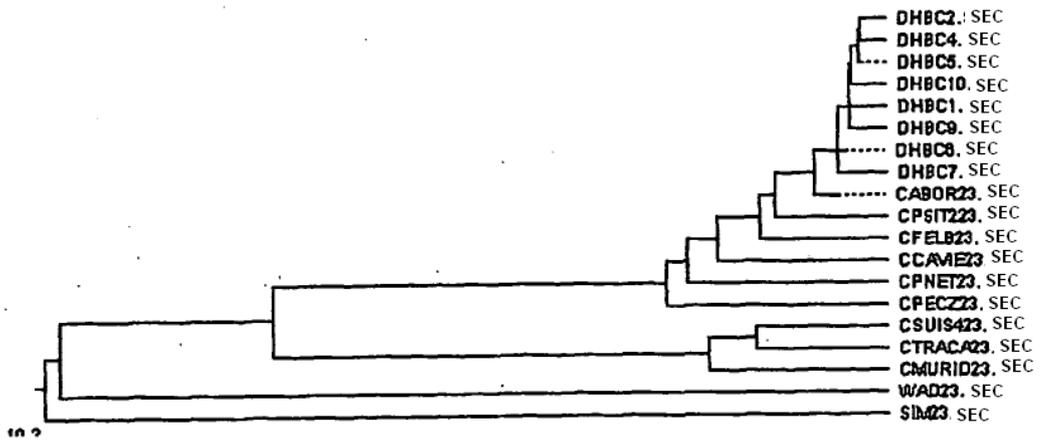


FIGURA 8

DHBC2

GACAGTGGTC TCCCCAGATT CAVACTAGGT TTCACGTGTC TAGCCCTACT
 CAGGTATCGA ATAGAGTCTC TTGTTTTTWC GTCTACGGGA CTATCACCCCT
 GTATCGTTCT ACTTTCCAGA AGTATTCGAC TAAAACCTAA GATCCCATGT
 TATCGACCCCT ACAACCCCCAC ATTAAAAATG TGGTTTGGTC TTCTCCCCTT
 TCGCTCGCCG CTACACAGGG A (SEC ID NO : 2)

DHBC4

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGACTAGG TTTCACGTGT CTAGCCCTAC
 TCAGGTATCG AATAGAGTCT CTTGTTTTTT CGTCTACGGG ACTAACACCC
 TGTATCGTTC TACTTTCCAG AAGTATTCGA CTAAAACCTA AGATCCCATG
 TTATCGACCC TACAACCCCA CATTAAAAAT GTGGTTTGGT CTTCTCCCCT
 TTTGCTCGCK CCGYTATCA X CAGGG (SEC ID NO : 3)

DHBC5

GADAGTGGTC TCCCCAGATT CADACTAGGT TTCACGTGTC TAGCCCTACT
 CAGGTATCGA ATAGAGTCTC TTGTTTTTTC GTCTACGGGA CTATCACCCCT
 GTATCGTTCT ACTTTYCAGA AGTATTCGAC TAAWWCTTAA GATCCCATGT
 TATCGACCCCT ACAACCCCCAC ATTWWWATG TGGTTTGGTC TTCTCCCCTT
 TYGCTCGCCG CTACACAGGG A (SEC ID NO : 4)

DHBC6

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGACTAGG TKtCACGTGT CTAGCCCTAC
 TCAGGTATCG AATAGAGTCT CTTGTTTTKT CGTCTACGGG ACTATCACCC
 TGTATCGTTC TACTTTCCCA GAAGTATTCG ACTAAAHAHT TAAGATcCCC
 ATGTTATCGA CCCTACAACc CCCACATDAA AAATGTGGTT TGGTCTTCTC
 CCCTTTGCT CGCCGCT (SEC ID NO : 5)

DHBC7

GABAGTGGTC TCCCCAGATT CAGACTAGGT TTCACGTGTC TAGCCCTACT
 CAGGTATCGA ATAGAGTCTC TTGTTTTTTC GTCTACGGGA CTATCACCCCT
 GTATCGTTCT ACTTTCCAGA AGTATTCGAC TAAAACCTAA GATCCCATGT
 TATCGACCCCT ACAACCCCCAC ATTAAAAATG TGGTTTGGTC TTCTCCCCTT
 TCGCTCGCCG CTACTCAGGG A (SEC ID NO : 6)

DHBC8

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGTCAAAA TATCACGTGT TCCGACCTAC
 TCAGGATACT ATTAGATATTA TTGAGAAATBT TAATTACAGG AGTATCACCT
 TCTATGCTCT AGTTTCCAAC TAATTCATCT ATTCTCTTTA ATTACACATT
 ATAGTCCTAC AAcCCCCMAA TGCAAGCATT GGGTTTGTCC TAATCCCAGT
 TCGCTCGCCG CTACACAGGG (SEC ID NO : 7)

DHBC9

TGAGAGTGGT CTCCCCAGAT TCAGACTAGG TTTCACGTGT CTAGCCCTAC
 TCAGGTATCG AATAGAGTCT CTTGTTTTTT TGTCTACGGG ACTATCACCC
 TGTATCGTTC TACTTTCCAG AAGTATTCGA CTAAAACCTA AGATCCCATG
 TTATCGACCC TACAACCCCA CATXAAAAT GTGGTTTGGT CTTCTCCCCT
 TTCGCTCGCC GCTACACAGG (SEC ID NO : 8)

FIGURA 9

