

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 088**

51 Int. Cl.:

A61K 39/02 (2006.01)

C12R 1/01 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.06.2011 PCT/US2011/042323**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.01.2012 WO12003205**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.06.2011 E 11730833 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2018 EP 2588133**

54 Título: **Vacuna contra Ehrlichia canis y métodos asociados**

30 Prioridad:

02.07.2010 US 360969 P

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

27.03.2018

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (50.0%)

Wim de Körverstraat 31

5831 AN Boxmeer, NL y

BOARD OF SUPERVISORS OF LOUISIANA

STATE UNIVERSITY AND AGRICULTURAL AND

MECHANICAL COLLEGE (50.0%)

72 Inventor/es:

O'CONNELL, KEVIN, A.;

RAMACHANDRA, RANGAPPA, NARAYANA;

GAUNT, STEPHEN, DAVID;

CORSTVET, RICHARD, E. y

WASMOEN, TERRI, LEE

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 661 088 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

Vacuna contra *Ehrlichia canis* y métodos asociados

5 REFERENCIA A SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud reclama prelación en virtud de 35 U.S.C. § 119(e) de la solicitud provisional serie de los EE.UU. n.º 61/360.969 presentada el 2 de julio de 2010.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones inmunogénicas y a vacunas contra la Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC), causada por la bacteria *Ehrlichia canis* y métodos asociados.

15 **Antecedentes**

La Ehrlichiosis Monocítica Canina (EMC) es una enfermedad por rickettsias en perros causada por la bacteria *Ehrlichia canis* (*E. canis*). La *E. canis* se transmite de perro a perro a través de la garrapata canina marrón (*Rhipicephalus sanguineus*). Después de un período de incubación de 2 a 3 semanas post-infección, los perros pueden progresar a través de fases agudas, subclínicas y crónicas de la enfermedad. En la fase aguda, las manifestaciones clínicas varían de leve a grave trombocitopenia, leucopenia, anemia, letargo y pérdida de peso. Después de dos meses, la mayoría de perros entran en una fase subclínica que dura meses o años, durante la cual pueden persisten bajos valores en sangre, pero las manifestaciones clínicas son mínimas. Un pequeño porcentaje de perros infectados puede desarrollar una forma grave de la enfermedad conocida como Pancitopenia Canina Tropical (PCT). La depresión de médula ósea persistente, hemorragias, trastornos neurológicos, edema periférico y pérdida de peso grave son características de la PCT. Puede desarrollarse un shock hipotensivo, lo que provoca la muerte. A pesar de los informes de composiciones inmunogénicas contra la *E. canis* [véase, por ejemplo, Mahan y col., Onderstepoort J. Vet. Res. 72(2): 119-128 (2005); US 2006/0188524A1] hasta aquí, no existe una demostración de una vacuna eficaz contra la *E. canis*. Por lo tanto, existe la necesidad de vacunas que protejan frente a la EMC y/o PCT.

La citación de cualquier referencia en el presente documento no debe interpretarse como una admisión de que tal referencia está disponible como "anterior a la técnica" en el momento de la solicitud.

35 **Breve resumen de la invención**

La presente invención proporciona vacunas y/o composiciones inmunogénicas para favorecer la respuesta inmune frente a una causa de ehrlichiosis. La composición de la vacuna y/o composición inmunogénica comprende un agente que cuando se administra como una primaria a un sujeto provoca la respuesta inmune humoral mínima, si la hay, en el sujeto. La composición inmunogénica comprende un agente que cuando se administra como una primaria provoca la respuesta inmune humoral mínima, si la hay, en el sujeto, pero aún provoca una respuesta inmune protectora. Una vacuna tal es una vacuna que comprende una *E. canis* inactivada desarrollada sobre una línea celular de la médula ósea de un perro. En particular, la vacuna puede comprender adicionalmente un adyuvante. El adyuvante es un factor de acordonamiento. El adyuvante de factor de acordonamiento se disuelve en un sistema de disolvente de cloroformo.

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición de vacuna y/o composición inmunogénica que comprende un antígeno de *E. canis* que cuando se administra de forma inicial a un sujeto (por ejemplo, como vacuna primaria) no provoca la producción de anticuerpos significativos frente al antígeno. Por consiguiente, la presente invención incluye composiciones inmunogénicas y/o composiciones que comprenden una cantidad inmunizante eficaz de antígeno de *E. canis* en el cual una administración inicial/vacuna primaria de la composición a un sujeto provoca una respuesta humoral mínima. En realizaciones particulares, la presente invención proporciona una composición inmunogénica y/o vacuna que después de una administración inicial/vacuna primaria no provoca una respuesta humoral medible, mientras que provoca una respuesta inmune protectora en un sujeto. En determinadas realizaciones una vacuna y/o composición inmunogénica de la presente invención en una vacunación primaria/administración inicial provoca una respuesta inmune celular, mientras que provoca una respuesta humoral mínima y/o no medible (por ejemplo, no detectable).

Por lo tanto, en un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una composición de vacuna que comprende una cantidad inmunizante eficaz de un antígeno del antígeno *E. canis*.

En algunas realizaciones de este tipo, el antígeno provoca una respuesta inmune protectora, pero provoca una respuesta humoral mínima en un sujeto cuando la vacuna se administra como una vacuna primaria. Las vacunas y/o composiciones inmunogénicas de la presente invención comprende un antígeno que se genera a partir de *E. canis* desarrollada y/o sometida a pasajes sobre una célula tal como se describe en el presente documento. En determinadas realizaciones, la *E. canis* se desarrolla y/o somete a pasajes sobre una línea celular canina. En realizaciones más particulares la línea celular puede ser una línea celular de médula ósea de perro. En realizaciones

más particulares, la célula tiene la referencia ATCC n.º PTA-10545, y/o una que tiene una o más, y/o todas las características identificativas de la célula que tiene la referencia ATCC n.º PTA-10545. En una realización particular, el antígeno de *E. canis* es un *E. canis* asociada a célula que tiene la referencia ATCC n.º PTA-10546, y/o una que tiene una o más, y/o todas las características identificativas del *E. canis* asociada a célula que tiene la referencia ATCC n.º PTA-10546.

La presente invención comprende adicionalmente una *E. canis* asociada a célula que tiene la referencia ATCC n.º PTA-10546. La presente invención también proporciona una *E. canis* asociada a célula que tiene una o más, y/o todas las características identificativas del *E. canis* asociada a célula que tiene la referencia ATCC n.º PTA-10546. Además, la presente invención proporciona una célula que tiene la referencia ATCC n.º PTA-10545. La presente invención proporciona adicionalmente una célula que tiene una o más, y/o todas las características identificativas de la célula que tiene la referencia ATCC n.º PTA-10545.

Además, los antígenos de *E. canis* de las vacunas y/o composiciones inmunogénicas de la presente invención pueden ser inactivadas. En determinadas realizaciones el antígeno de *E. canis* inactivado se inactiva con formol.

La presente invención proporciona vacunas y/o composiciones inmunogénicas que comprenden un adyuvante. El adyuvante es un adyuvante lipofílico. El adyuvante lipofílico se encuentra dentro de un disolvente no polar. El adyuvante comprende un factor de acordonamiento tal como 6,6' dimicolato de trehalosa. En particular, el 6,6' dimicolato de trehalosa se encuentra dentro de un disolvente no polar. Más en particular, el adyuvante comprende 6,6' dimicolato de trehalosa disuelto en un sistema de disolventes de cloroformo. En particular, el sistema de disolventes de cloroformo comprende aproximadamente el 65-95 % de cloroformo volumen/volumen. En realizaciones más particulares, el sistema de disolventes de cloroformo comprende aproximadamente el 80-95 % de cloroformo volumen/volumen. En realizaciones particulares, el sistema de disolventes de cloroformo comprende aproximadamente el 5,0-30 % de metanol volumen/volumen. En realizaciones más particulares, el sistema de disolventes de cloroformo comprende aproximadamente el 7,5-15 % de metanol volumen/volumen. En particular, el sistema de disolventes de cloroformo comprende aproximadamente el 0,5-5,0 % de agua volumen/volumen. En realizaciones más particulares, el sistema de disolventes de cloroformo comprende aproximadamente el 0,75-2,5 % de agua volumen/volumen. En determinadas realizaciones, el sistema de disolventes de cloroformo comprende aproximadamente el 90 % de cloroformo: 10 % de metanol: 1,0 % de agua volumen a volumen, respectivamente. En realizaciones particulares, la vacuna y/o composición inmunogénica comprende una *E. canis* asociada a célula inactivada con formol desarrollada en las células depositadas que tienen la referencia ATCC n.º No. PTA-10545 y un adyuvante que comprende 6,6' dimicolato de trehalosa disuelto en 90:10:1 de cloroformo:metanol:agua. Una composición que comprende un factor de acordonamiento, tal como 6,6' dimicolato de trehalosa, disuelto en un sistema de disolventes de cloroformo también es parte de la presente invención, así como su uso como adyuvante.

Además, la presente invención proporciona bacterias de *E. canis* desarrolladas sobre células y/o líneas celulares que son particularmente adecuadas para su crecimiento. La presente invención proporciona adicionalmente procesos para la producción de un antígeno para una vacuna y/o composición inmunogénica de la presente invención. De este modo, la presente invención proporciona procesos para la producción de antígeno de *E. canis*. En realizaciones particulares, la *E. canis* se desarrolla sobre un macrófago. En determinadas realizaciones las bacterias de *E. canis* se desarrollan sobre una línea celular similar a macrófagos. En determinadas realizaciones la *E. canis* se desarrolla sobre una célula de médula ósea de perro (MOP) para producir un antígeno de *E. canis* asociado a células. En realizaciones particulares las bacterias de *E. canis* se desarrollan sobre una línea celular de MOP. En realizaciones particulares, la línea celular de MOP es MOP (WCS) MCS+12, ATCC n.º de referencia PTA-10545. En realizaciones particulares, la *E. canis* está asociada a célula, WS MS+3, 19517-001, n.º de referencia ATCC PTA 10546. En realizaciones alternativas, la *E. canis* se desarrolla sobre una línea celular DH-82.

Un antígeno de *E. canis* de la presente invención puede ser una *E. canis* inactivada. En realizaciones particulares, el antígeno de *E. canis* es una bacterina. En particular, el antígeno de *E. canis* inactivado es está asociado a células.

La presente invención también describe métodos de inmunización de un sujeto frente a *E. canis*. Tales métodos pueden incluir la administración a un sujeto de una composición de vacuna y/o una composición inmunogénica de la presente invención. Determinados métodos comprenden la administración de una vacuna y/o composición inmunogénica de acuerdo con la invención al sujeto intradérmicamente. Otro tal método comprende la administración de una vacuna y/o composición inmunogénica de acuerdo con la invención al sujeto subcutáneamente. Aún otro tal método comprende la administración de una vacuna y/o composición inmunogénica de acuerdo con la invención al sujeto oralmente. En métodos particulares, el sujeto animal es un cánido. En otro método, el sujeto animal es un felino (por ejemplo, un gato doméstico). En particular, una segunda dosis de la composición de vacuna y/o composición inmunogénica se proporciona como un refuerzo. En determinados métodos el refuerzo se administra aproximadamente 21 días después de la dosis inicial de la composición de vacuna.

La presente invención proporciona adicionalmente un método de fabricación de las composiciones de vacuna y/o composiciones inmunogénicas de la presente invención. En determinadas realizaciones la presente invención proporciona un proceso para producir un antígeno de *E. canis* tal como se describe en el presente documento. Las composiciones de la vacuna y/o composiciones inmunogénicas se preparan mezclando un antígeno de la presente

invención con un excipiente veterinario adecuado. En tal método, el antígeno es una bacterina de *E. canis* asociada a células. En realizaciones particulares, el excipiente veterinario adecuado es un adyuvante de factor de acordonamiento disuelto en un sistema de disolventes de cloroformo.

- 5 Estos y otros aspectos de la presente invención se comprenderán mejor en referencia a los dibujos, Descripción detallada y ejemplos.

Breve descripción de los dibujos

10 La FIG. 1 es una representación gráfica de los recuentos de glóbulos blancos promedios después de la prueba a lo largo del tiempo de animales de control (triángulos) y animales vacunados (cuadrados). La línea gruesa indica el nivel mínimo de recuentos de glóbulos blancos considerados normales de acuerdo con el Merck Manual.

15 La FIG. 2 es una representación gráfica de los recuentos de glóbulos rojos promedios después de la prueba a lo largo del tiempo de animales de control (triángulos) y animales vacunados (cuadrados). La línea gruesa indica el nivel mínimo de recuentos de glóbulos rojos considerados normales de acuerdo con el Merck Manual.

20 La FIG. 3 es una representación gráfica de los valores de hemoglobina promedios después de la prueba a lo largo del tiempo de animales de control (triángulos) y animales vacunados (cuadrados). La línea gruesa indica el nivel mínimo de recuento de hemoglobina considerado normal de acuerdo con el Merck Manual.

25 La FIG. 4 es una representación gráfica de los valores de hematocritos promedios después de la prueba a lo largo del tiempo de animales de control (triángulos) y animales vacunados (cuadrados). La línea gruesa indica el nivel mínimo de recuento de hematocritos considerado normal de acuerdo con el Merck Manual.

La FIG. 5 es una representación gráfica de los recuentos de plaquetas promedios después de la prueba a lo largo del tiempo de animales de control (triángulos) y animales vacunados (cuadrados). La línea gruesa indica el nivel mínimo de recuentos de plaquetas considerado normal de acuerdo con el Merck Manual.

30 **Descripción detallada de la invención**

La presente invención proporciona composiciones inmunogénicas y vacunas que pueden reducir la incidencia de trombocitopenia, leucopenia, anemia y pérdida de peso seguido de una prueba con una cepa virulenta de *E. canis*. Los presentes resultados son inconsistentes con los informes anteriormente publicados con respecto a perros infectados, que han sido curados mediante tratamiento con antibióticos, pero fueron susceptibles a una enfermedad posterior (véase, por ejemplo, Breitschwerdt y col., Antimicrobial Agents and Chemotherapy 42(2) 362-368 (1998)). Estos anteriores informes sugieren que una inmunidad protectora no desarrolla una exposición posterior al organismo. En contraste directo, la presente invención proporciona métodos para la mejora y/o prevención de ehrlichiosis monocítica canina (EMC) y/o pancitopenia canina tropical (PCT), en un sujeto mediante la administración al sujeto de una composición inmunogénica y/o una composición de vacuna de la presente invención. De este modo, en un aspecto la presente invención proporciona una vacuna eficaz contra la *E. canis*.

45 Tal como se describe en el presente documento, durante el desarrollo de un modelo de prueba de *E. canis*, los perros desarrollan rápidamente una respuesta de anticuerpos humoral a la *E. canis*. En correlación con el aspecto del anticuerpo de anti-*E. canis* es una caída rápida en el recuentos de plaquetas, o trombocitopenia y el inicio de varias otras indicaciones clínicas. Sin embargo, las vacunas que inducen respuestas de anticuerpos humorales fuertes en perros no consiguen protegerlos de las manifestaciones clínicas de la enfermedad. De hecho, los perros vacunados que producen una respuesta de anticuerpos fuerte a la *E. canis* pueden tener resultados clínicos peores que los compañeros no vacunados después de la prueba. Sin limitarse ninguna teoría concreta, los resultados descritos en el presente documentos parecen consistentes con la *E. canis* que usa los anticuerpos producidos contra esa para ganar acceso al interior de las células a través del proceso de la opsonización.

50 La presente invención proporciona adicionalmente procesos para la producción de un antígeno para una composición inmunogénica y/o una vacuna misma. En particular, el proceso comprende cultivar *E. canis* sobre una línea celular en particular para producir el antígeno. En el proceso de la invención, el antígeno se mezcla con un excipiente veterinario adecuado. En realizaciones más particulares la presente invención incluye una composición que comprende una *E. canis* inactivada desarrollada sobre una línea celular de la médula ósea de un perro. Las composiciones inmunogénicas y/o vacunas de la presente invención pueden incluir un adyuvante.

60 Aunque el mecanismo selectivo para el cual la *E. canis* discrimina qué células infectar es poco comprendido, las células adecuadas para la infección comúnmente expresan los receptores del antígeno del complejo mayor de histocompatibilidad humano (CMH) de clase II. Harris y col. [Vet. Immunol. Immunopathol., 96:239-243 (2003)] ha demostrado que la *E. canis* posee un mecanismo para regular la expresión de los receptores de CMH de clase II sobre la superficie de células que infecta como posible mecanismo para evitar la vigilancia inmune. Mientras que resulta claro que las líneas celulares derivadas de especies de garrapatas no expresan receptores de CMH de clase II de mamíferos, Singu y col. [Cellular Microbiology, 8(9), 1475-1487 (2006)] han demostrado que la *E. canis* altera

su expresión de proteína de superficie dependiendo de si está infectando a un huésped vertebrado o invertebrado. Por consiguiente, en otro aspecto, la presente invención proporciona células y/o líneas celulares que satisfacen el crecimiento de *E. canis*, mientras que el mismo tiempo producen un antígeno de *E. canis* que ha sido optimizado para el uso en vacunas.

5 Como se usa en el presente documento, "sujeto" se refiere a cualquier especie que puede ser infectada por *E. canis*. El sujeto puede ser un sujeto animal no humano. El sujeto puede ser bien un cánido o un felino. El sujeto animal puede ser un cánido. El sujeto animal es un felino.

10 Tal como se usa en el presente documento, el término, "cánido" incluye todos los perros domésticos, *Canis lupus familiaris* o *Canis familiaris*, a menos que se indique lo contrario.

Una "cantidad inmunizante eficaz", tal como se usa en el presente documento, puede variar dependiendo de la cepa o cepas de *E. canis* usada para generar la vacuna y puede ser cualquier cantidad suficiente para provocar una respuesta inmune protectora.

15 Aunque como se usa en el presente documento, una "respuesta inmune protectora" puede ser una respuesta inmune en un sujeto que lleva a la protección frente a una o más indicaciones de infección, una "respuesta inmune protectora" no requiere la protección completa de cualquier indicación de infección. Más bien, una "respuesta inmune protectora" puede ser una respuesta inmune que es suficiente de modo que, después de la prueba, los síntomas de la infección subyacente son al menos reducidos, y/o al menos una o más de las causas o mecanismos celulares, fisiológicas, o bioquímicas subyacentes que causan los síntomas se reducen y/o eliminan. Se comprende que "reducido", como se usa en este contexto, significa con respecto al estado de la infección, incluyendo el estado molecular de la infección, no solo el estado fisiológico de la infección. Las vacunas de la presente invención están destinadas a proporcionar una respuesta inmune protectora.

20 Como se usa en el presente documento, "provocar una respuesta humoral mínima" significa que la administración de la composición de vacuna que comprende *E. canis* en una vacunación primaria a un sujeto (por ejemplo, un cánido) no resulta en la detección de anticuerpos a *E. canis* en sueros de ensayo obtenidos del sujeto 21 días después de una exposición primaria a la composición de vacuna, cuando esa detección se realiza mediante el siguiente procedimiento: exponer una dilución de 1:40 de los sueros de ensayo a *E. canis* fijado, lavar de forma suficiente para retirar todo el material no unido, añadir un anticuerpo anti-IgG marcado de forma fluorescente adecuado a la especie del sujeto, lavar de forma suficiente para retirar todo el material no unido, y a continuación inspeccionar visualmente la fluorescencia debido a los anticuerpos anti-IgG marcados de forma fluorescente unidos a la *E. canis* fijadas a través de anticuerpos específicos para *E. canis*. La administración de forma adecuada al sujeto una única vacunación de refuerzo posterior de la vacuna aún no provoca una respuesta humoral significativa frente a la *E. canis* y requiere una dilución de 1:160 o menos de los sueros de ensayo obtenidos a partir del sujeto animal después de la exposición a la composición de vacuna de refuerzo para detectar anticuerpos a *E. canis* en los sueros de ensayo, si son en todo caso detectables, cuando se administran mediante el método realizado para la vacuna primaria anterior.

40 Como se usa en el presente documento, el término línea celular "infectada de forma estable" se refiere a una línea celular que permanece infectada de principio a fin al menos 10 pasajes de cultivo celular.

45 Antígenos

Los antígenos de *E. canis* de la presente invención puede derivarse de cualquier número de fuentes o cepas de *E. canis*. Ejemplos de tales cepas de *E. canis* incluyen, pero sin limitación, Ebony, Broadfoot, Florida, Israel 611, Kogashima 1, Louisiana, Oklahoma, Venezuela, North Carolina State University (NCSU) cepa Jake y NCSU aislados Demon, D J, and Fuzzy. En determinadas realizaciones, el antígeno puede ser una bacteria de *E. canis*. En realizaciones adicionales, el antígeno puede derivarse de bacterias de *E. canis* que han sido inactivados mediante cualquier método adecuado disponible. Ejemplos de tales métodos incluyen, pero sin limitación, calor, formaldehído, formol, amina de bi-etileno, radiación y tratamiento con beta-propiolactona. En realizaciones particulares, las bacterias de *E. canis* pueden inactivarse mediante tratamiento con formol.

55 En realizaciones particulares, el antígeno de *E. canis* puede comprender uno o más antígenos que no se reconocerán como extraños por un sujeto cuando el uno o más antígenos se proporcionan al sujeto, es decir, el sujeto no fijará una respuesta humoral ni fijará una respuesta humoral mínima al uno o más antígenos. En algunas realizaciones el uno o más antígenos de *E. canis* no provocarán la producción de anticuerpos, o de forma alternativa, provocará la producción mínima de anticuerpos contra el uno o más antígenos de *E. canis*. Además, tales antígenos de *E. canis* provocarán una respuesta inmune protectora contra el uno o más antígenos de *E. canis*. La presente invención incluye una composición inumonogénica para vacunar un cánido contra ehrlichiosis del tipo que comprende un agente que conduce a una respuesta inmune en el cánido, utilizando, como agente, uno que produzca poca o no produzca una respuesta inmune humoral en el cánido, pero aún provoque una respuesta inmune protectora en el cánido. En realizaciones particulares, esta respuesta inmune protectora se debe, al menos en parte, a una respuesta inmune mediada por células.

Células

Las bacterias de *E. canis* de la presente invención pueden desarrollarse sobre una célula adecuada y/o sobre una línea celular. Por consiguiente, un antígeno de *E. canis* puede producirse a partir de bacterias de *E. canis* cultivadas sobre o propagadas sobre una línea celular. Ejemplos de tales células y líneas celulares incluyen células primarias (por ejemplo, macrófago) y/o líneas celulares/ líneas celulares continuas tales como las que se enumeran a continuación:

Líneas celulares primarias:

- Macrófagos en sangre canina, véase, por ejemplo, [Nyindo, y col. Am. J. Vet. Res. 32:1651-1658 (1971)].
- Macrófagos peritoneales, véase, por ejemplo, [Stephenson y Osterman, Am. J. Vet. Res. 38:1815-1819 (1977)].

Líneas celulares continuas:

- Línea celular híbrida humano/perro, [véase, por ejemplo, Stephenson y Osterman, Am. J. Vet. Res. 41:234-240 (1980)].
- Línea celular de macrófagos caninos (DH-82), [véase, por ejemplo, Dawson, y col., J. Infect. Dis. 163:564-567 (1991)].
- Macrófagos peritoneales de ratón; línea celular híbrida ratón/perro (MDH-SP), [véase, por ejemplo, Holland y Ristic, Abstr 55,p. 89, in Program and Abstracts of the IVth International Symposium on Rickettsiae and Rickettsial Diseases, Piestany Spa, Czech and Slovak Federal Republics].
- Línea celular de macrófagos de ratón, [véase, por ejemplo, Keysary, y col., J VEt Diagn Invest 13:521-523 (2001)].
- Línea celular de médula ósea de perro (células de MOP), [véase, por ejemplo, Gaunt y col. J. Clin Micro. 34 (6):1429-1432 (1996)].
- Línea celular de fibroblastos embrionarios felinos (FEF), [véase, por ejemplo, Battles y col., documento WO 2009/036177 A1].
- Líneas celulares de garrapatas (IDES y ISE6), [véase, por ejemplo, Munderloh, y col. documento U. S. 5.869.335].

En un aspecto de la invención la línea celular es una línea celular similar a macrófagos, que expresa receptores de superficie similares a los expresados por macrófagos caninos. En realizaciones relacionadas la línea celular es una línea celular similar a macrófagos. En realizaciones particulares de este tipo, la línea celular empleada en la línea celular DH-82, que tiene el n.º de referencia ATCC CRL-10389.

La presente invención incluye *E. canis* que se han desarrollado sobre una línea celular de mamífero monocítica o similar a macrófagos. En determinados casos estas líneas celulares se han inmortalizado para proporcionar un sustrato de crecimiento continuo y fiable para la fabricación de vacunas. Las células inmortalizadas pueden crearse a partir de células progenitoras neoplásticas tales como la línea celular DH-82 descrita por Wellman y col. [In Vitro Cell Develop Biol 24:223-228, (1988)]. Las células pueden inmortalizarse mediante el uso de genes virales. El virus simio 40 (SV40) de antígeno T ha demostrado ser un modo muy fiable para crear células inmortalizadas e híbridos de células somáticas de macrófagos peritoneales caninos hibridizados con células humanas transformadas con SV40 se usaron para cultivar *E. canis* de un modo continuo por Stephenson y col. [Am J V et Res 41(2):234-40, (1980)]. Puede usarse una amplia variedad de agentes para inmortalizar células incluyendo distintos virus, rayos x, disolventes orgánicos, compuestos de metal y ácidos nucleicos. Estos métodos han sido revisados de forma exhaustiva por Rhim [Annals NY Acad of Sci. 919:16-25 (2000)]. En determinadas realizaciones de la presente invención, la *E. canis* se desarrolla en tales líneas celulares y a continuación se inactiva para formar un antígeno de bacterina de *E. canis*.

En determinadas realizaciones, la línea celular es una línea celular de médula ósea de perro (MOP). En realizaciones particulares, la línea celular de MOP es la que se describe por Gaunt y col. [J Clin. Microbio. 34 (6): 1429-1432, (1996)]. En realizaciones particulares, la línea celular de MOP es la cepa depositada de n.º de referencia ATCC PTA-10545. En determinadas realizaciones esa línea celular es una línea celular de MOP que está infectada de forma estable con *E. canis*. En una realización particular de este tipo la *E. canis* asociada con células se deposita y tiene el n.º de referencia ATCC PTA-10546. En realizaciones alternativas, la línea celular es una línea celular de insecto. En realizaciones particulares de este tipo, la línea celular de insecto es una línea celular de garrapata. En una realización particular, esta línea celular de insecto es la línea celular de garrapata IDE8, aislada de *Ixodes scapularis*, que se deposita con el ATCC y tiene el n.º de referencia ATCC CRL-11973.

Propagación de *E. canis*

Un cultivo celular infectado con *E. canis* puede cultivarse en matraces y posteriormente pasarse a matraces más grandes para obtener volúmenes más grandes de material requerido para fabricar composiciones inmunogénicas y/o vacunas. Como alternativa, el cultivo celular infectado puede pasarse de matraces en frascos rotativos posteriores, matraces de agitación, cubos celulares, biorreactores o cualquier aparato capaz de desarrollar cultivo celular a gran escala para producir una cantidad adecuada de material requerido para mezclar una composición inmunogénica y/o una vacuna. Los cultivos infectados pueden congelarse en un medio adecuado para la infección de cultivo celular posterior.

Las células pueden ser adherentes y unirse al matraz de cultivo o aparato, incluyendo microportadores unidos o, de forma alternativa, flotando en suspensión. Métodos para retirar células adheridas incluyen, pero sin limitación, el raspado manual del matraz usando raspadores celulares mecánicos o el tratamiento con una solución de tripsina para retirarlas del matraz y neutralizar posteriormente la tripsina sin usar con una solución de proteínas. A continuación, las células pueden centrifugarse a concentrado o resuspenderse en un medio de congelación adecuado. Los medios de congelación incluyen, pero sin limitación, medios que contienen un 10-90 % de suero fetal bovino y un 1-20 % de sulfóxido de dimetilo (DMSO). Otros crioconservantes pueden usarse que pueden ser más adecuados para las distintas líneas celulares y resulten en un alto nivel de viabilidad después de descongelar y reiniciar el cultivo.

Para iniciar un cultivo infectado, las células no infectadas pueden retirarse del congelador y cultivarse en un medio adecuado. Por ejemplo, 1 ml de vial que contiene 1×10^5 de células de MOP se descongela rápidamente y se coloca en un matraz de cultivo de tejidos T-75 (área de superficie de 75cm^2) que contiene un medio adecuado para el cultivo de las células de MOP. En una realización particular, el medio es un medio de cultivo completo de Fischer. Un litro de medio de cultivo de Fischer para células de MOP, por ejemplo, se realiza añadiendo 200 ml de suero de caballo a 770 ml de medio de Fischer. El medio se completa añadiendo 10 ml de una solución de hidrocortisona de 2 mg/ml, 10 ml de una solución de glutamina de 200 mM y 10 ml de una solución de HEPES de 1M.

Una vez el cultivo de MOP alcanza un nivel adecuado de confluencia (10-90 %), el cultivo está listo para ser infectado. Un vial de cultivo infectado se retira del congelador, se descongela rápidamente y se suministra sobre el cultivo de crecimiento. El cultivo se desarrolla a $36 \pm 2^\circ\text{C}$ en matraces cubiertas o ventiladas con o sin suplemento de CO_2 . El cultivo se mantiene según los métodos comunes para un experto en la técnica pasando las células en medio fresco según se requiera. Después de varias semanas, el cultivo puede evaluarse para el nivel de infección por microscopía por fluorescencia indirecta usando anticuerpos anti-*E. canis* u otros métodos adecuados. Los cultivos pueden alcanzar un nivel de infección del 90 % o superior. Un nivel superior de infección es más deseable ya que resulta en un rendimiento superior de material antigénico por volumen de cultivo. El cultivo infectado puede pasarse a volúmenes más grandes de cultivo mediante el movimiento del cultivo a matraces más grandes, botellas rotativas y otros recipientes de cultivo adecuados.

La infección del cultivo celular de *E. canis* puede determinarse mediante varios métodos que incluyen, pero sin limitación, análisis microscópico de células teñidas con tintes tales como tinción de Giemsa, tinción de Cameo Difquick o naranja de acridina. Además, los anticuerpos específicos para la *E. canis* pueden marcarse de forma directa o indirecta con marcadores fluorescentes y verse con un microscopio de luz fluorescente y a una longitud de onda adecuada para el marcador fluorescente en particular. Pueden usarse otras técnicas para determinar el nivel de infección del cultivo que incluyen, pero sin limitación, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RCPc) o RCP.

Las células no infectadas pueden añadirse al cultivo según se necesite para mantener un determinado nivel de infección en el cultivo. Cuando se alcanza un volumen adecuado de cultivo, el cultivo puede inactivarse por varios métodos que incluyen, pero sin limitación, métodos químicos o térmicos. Antes de la inactivación, el cultivo puede dosificarse para determinar la cantidad de partículas infecciosas en el cultivo como un método para determinar cuánto cultivo inactivado posterior añadir a la mezcla. Un método para valorar de un cultivo infectado se proporciona en los ejemplos a continuación. En determinadas realizaciones, el formol se añade al cultivo en una concentración final del 0,05 % y el cultivo se mezcla durante tres días a $36 \pm 2^\circ\text{C}$. Otros tales inactivadores que pueden usarse incluyen, pero sin limitación: etileniminas (EI, BEi), beta propiolactona y fenol. También pueden usarse antibióticos para inactivar el cultivo como la deoxiciclina o cualquier otro antibiótico a la que la *E. canis* sea sensible.

El cultivo puede evaluarse por cualquier número de métodos para determinar su viabilidad. Dichos métodos incluyen, pero sin limitación, valoración por retroceso sobre el cultivo celular, integridad de la membrana para soportar tintes no permeables e inyección a perros y control de síntomas típicos de infección.

Una vez inactivado, el cultivo puede concentrarse mediante cualquier número de métodos. Por ejemplo, la concentración de la *E. canis* no viable puede realizarse mediante centrifugado, ultra-filtración o evaporación. En una realización particular, las células de MOP que están infectadas con *E. canis* se inactivan y a continuación centrifugan a $1400 \times g$ durante 15 minutos para aglomerar las células completas. El sobrenadante se desecha y el sedimento se vuelve a suspender en medio de Fischer sin suero. Gentamicina o un conservante similar, puede añadirse después

de la inactivación para evitar problemas de contaminación. El cultivo se vuelve a suspender en medio de Fischer sin suero a una décima parte del volumen original para concentrar el cultivo inactivado y facilitar su manipulación. La cantidad de antígeno disponible en el concentrado inactivado puede determinarse mediante cualquier número de métodos incluyendo cromatografía, espectroscopia o varios tipos de inmunoensayos específicos. El volumen de antígeno puede mezclarse con diluyentes y un adyuvante para fabricar una vacuna aceptable.

Composiciones inmunogénicas y vacunas

Tal como se ha indicado anteriormente, las composiciones inmunogénicas y/o vacunas que comprenden un antígeno de la presente invención (por ejemplo, una bacterina de *E.canis*) incluyen adicionalmente uno o más adyuvantes farmacéuticamente aceptables. Ejemplos de adyuvantes farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.) y GOODMAN AND GILMAN'S, THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS (10th ed. 2001). En particular, el adyuvante puede ser uno que estimule una respuesta inmune mediada por células, pero no estimule una respuesta inmune humoral.

Las composiciones inmunogénicas y/o vacunas de la presente invención que comprenden adicionalmente un adyuvante pueden comprender uno o más elementos generalmente no solubles en agua. En particular, el adyuvante es un soluto no polar disuelto en un disolvente no polar. Ejemplos de disolventes no polares incluyen, pero sin limitación, hexano, benceno, tolueno, éter dietílico, cloroformo y acetato de etilo. En particular, el disolvente es un sistema de disolventes de cloroformo. El cloroformo es no inflamable y más adecuado para fabricar biológicos veterinarios. Un ejemplo ilustrado en el presente documento es 6,6' dimicolato de trehalosa en un sistema de disolventes de cloroformo.

Disolventes no polares son normalmente insolubles en agua y, por lo tanto, el uso de disolvente polar con una constante dieléctrica relativamente baja, pero con buena solubilidad en agua puede usarse en el sistema de disolventes para aumentar la solubilidad de la mezcla de adyuvantes en una solución acuosa. Ejemplos de disolventes polares incluyen, pero sin limitación, metanol, etanol, isopropanol, sulfóxido de dimetilo y dimetilformamida. El adyuvante no polar es un factor de acordonamiento que es 6,6' dimicolato de trehalosa. Otros adyuvantes no polares pueden ser útiles en la estimulación de la inmunidad medida por células que incluyen, pero sin limitación, fracciones hidrofóbicas o saponinas purificadas, lipopéptidos bacterianos (Pam₃CSK₄) y monofosforil lípido A. En particular, el factor de acordonamiento se disuelve en un sistema de disolventes de cloroformo. En particular, el sistema de disolventes de cloroformo comprende aproximadamente el 65-95 % de cloroformo volumen/volumen.

Por consiguiente, determinadas realizaciones de sistemas de disolventes de cloroformo incluyen, pero sin limitación, sistemas de disolventes que comprenden cloroformo y metanol. En un ejemplo no limitante, el sistema de disolventes de cloroformo puede comprender aproximadamente del 70 % al 95 % de cloroformo y/o aproximadamente del 5 % al 30 % de metanol volumen/volumen. En algunas realizaciones de este tipo, el sistema de disolventes de cloroformo comprende adicionalmente el 0,5-5,0 % de agua volumen/volumen. En un ejemplo no limitante, el sistema de disolventes de cloroformo puede comprender noventa partes de cloroformo por volumen, diez partes de metanol por volumen y una parte de agua por volumen [es decir, aproximadamente el 90 % de cloroformo: 10 % de metanol: 1,0 % de agua volumen a volumen, respectivamente]. En realizaciones particulares, el adyuvante puede comprender un factor de acordonamiento y/u otros adyuvantes disueltos en un sistema de disolventes de cloroformo. En una realización de este tipo, el adyuvante es 6,6' dimicolato de trehalosa, el cual se disuelve en el sistema de disolventes de cloroformo: 90 ml de cloroformo: 10 ml de metanol: 1 ml de agua.

En realizaciones particulares, la composición de vacuna puede comprender uno o más portadores o diluyentes farmacéutica o veterinariamente aceptables. Ejemplos no limitantes de portadores o diluyentes que pueden usarse en las formulaciones de composición de vacuna incluyen agua, soluciones de glucosa, dextrosa/salina, solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), tampón de HEPES, medio de Fischer, solución de Hank y solución de Ringer. Tales formulaciones pueden contener sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables para potenciar la estabilidad, derivabilidad o solubilidad, como amortiguadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes humectantes, detergentes y similares. Los aditivos también pueden incluir ingredientes activos adicionales tales como agentes bactericidas o estabilizadores. Por ejemplo, la solución puede contener timerosal, gentamicina, acetato de sodio, lactato sódico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, monolaurato de sorbitán o oleato de trietanolamina. Las composiciones pueden esterilizarse mediante técnicas de esterilización convencionales, y conocidas.

En determinadas realizaciones, se contempla que la composición de vacuna pueda comprender adicionalmente otros componentes activos tales como, pero sin limitación, un componente antipatogénico dirigido contra, o un componente antigénico y/o aislado atenuado y/o muerto de: virus de la rabia, enfermedad de Lyme (*Borrelia burgdorferi*), virus del moquillo canino, Bordetella canina, parvovirus canino, adenovirus canino, coronavirus canino, *Babesia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Giardia*; *leptospira interrogans* tal como serovars *canicola*, *icterohaemorrhagiae*, *pomona*, *grippotyphosa* o *bratislava* o similares, o cualquier combinación de las mismas. En algunas realizaciones, la vacuna y/o composición inmunogénica puede formularse en una forma de unidad de

dosificación para facilitar la administración y asegurar la uniformidad de la dosificación. En el presente documento, una unidad de dosificación según pertenece a la composición de vacuna se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para un sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de antígeno de *E.canis* calculado para producir el efecto inmunogénico deseado en asociación con un adyuvante, portador, o vehículo. En determinadas realizaciones, la composición inmunogénica y/o vacuna se

leofiliza.

En determinadas realizaciones las vacuna y/o composición inmunogénica puede administrarse de forma parenteral, por ejemplo, intramuscular, vía subcutánea, intraperitoneal, intradérmicamente o similar, o la composición inmunogénica y/o vacuna puede administrarse oralmente o intranasalmente cantidades eficaces de acuerdo con una programación determinada por el tiempo de exposición potencial a un portador de *E. canis*. De este modo, el sujeto tratado puede tener tiempo para construir una inmunidad antes de su exposición natural. Por ejemplo, una programación de tratamiento típico puede incluir la inyección subcutánea al menos 42 días antes de la exposición potencial. En realizaciones, puede proporcionarse más de una administración de la composición de vacuna a un sujeto. A modo de ejemplo no limitante, una primera vacuna a los aproximadamente 42 días y una segunda a los aproximadamente 21 días antes de la exposición potencial del sujeto. Sin embargo, la aparición de la inmunidad de podría producir un transcurso de tiempo más rápido.

Administración de vacunas

Las vacunas de la presente invención pueden administrarse como un líquido, emulsión, polvo seco, incluyendo como un polvo liofilizado y/o en una bruma a través de cualquier vía parenteral, vía intravenosa, intraperitoneal, intradérmica, por escarificación, vía subcutánea, vía intramuscular o inocularse mediante una vía mucosa, *por ejemplo*, por vía oral, intranasal, como un aerosol, por gotas en los ojos, por administración *in ovo* o implantado como un polvo liofilizado.

Depósito de ATCC

Un cultivo del siguiente material biológico se ha depositado con el siguiente depositario internacional por:

Board of Supervisors,
Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College and LSU Agricultural Center, 104 Efferson Hall, Baton Rouge, Louisiana, 70803

Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) 10801 University Boulevard, Manassas, Va. 20110-2209, EE.UU., en las condiciones que satisfacen los requisitos del Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos para los fines de Procedimiento de Patentes.

Organismo	N.º de referencia de ATCC	Fecha de depósito
Célula de médula ósea de perro	PTA-10545	22 de diciembre de 2009
<i>E. canis</i> asociada a células	PTA-10546	22 de diciembre de 2009

La presente invención puede entenderse mejor con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes, que se proporcionan como ilustrativos de la presente invención. Los siguientes ejemplos se presentan para ilustrar de forma más completa las realizaciones preferidas de la invención. No deben interpretarse de ningún modo, sin embargo, como limitantes del amplio alcance de la invención.

Ejemplos

Ejemplo 1

Tabla 1

<u>Composición de vacuna</u>	
Fracción de antígeno	Volumen/peso usado
Antígeno de <i>E. canis</i> inactivado con formar en un título de 6,5 log10 TCIDso/ml	315 ml
Adyuvante: 6,6' dimicolato de trehalosa 100 mg disueltos en Sistema de disolventes de cloroformo	101 ml
Sistema de disolventes de cloroformo	
Cloroformo	90 ml

Metanol	10ml
Agua	1ml
Medio de Fischer	9479 ml
1 M de tampón de HEPES	94,9 ml
Solución de 10 % de timerosal	9,1 ml
Solución de gentamicina	0,96 ml
Volumen de mezcla total	10 l

Ejemplo 2

Diseño de estudio y resultados:

5

Tabla 2

<u>Descripción del animal de prueba</u>	
Especie	Cánido
Edad inicial	9-11 meses
Sexo	Hembra
Raza	Beagles de laboratorio
Intervalo de peso corporal inicial	9,0-16,6 kg el día de la prueba
Número de animales	16
Método de identificación	Tatuaje auricular
Criterios de inclusión	Examen físico por un veterinario antes del estudio y se determinaron sanos y adecuados para su uso. Serológicamente negativos de anticuerpos a <i>E. canis</i> ($\leq 1:40$) antes de la primera vacuna, valores de recuento plaquetario normal ($\geq 200.000/\mu\text{l}$) antes de la prueba.
Criterios de exclusión	Cualquier animal que no cumple con los criterios de inclusión.

ALOJAMIENTO Y ZOOTECNIA:

10 Aclimatación/acondicionamiento: Los animales se tomaron de un grupo preexistente y, por lo tanto, no fue necesario ningún tratamiento ni acondicionamiento. Los animales se aclimataron durante al menos 7 días antes del inicio del estudio. Todos los animales se sometieron a prácticas de zootecnia buenas normales a través del estudio y procedimiento rutinario y se estandarizó en todos los animales.

15 Alojamiento: Los perros se alojaron en grupo aleatoriamente en recintos (4-5 perros por recinto) independientemente de los grupos de tratamiento.

Dieta: Se proporcionó agua *ad libitum* a los animales. La alimentación cumplió con los requisitos nutricionales mínimos para animales de esta edad y cumplió los procedimientos estándares.

20

Tabla 3

<u>Asignaciones de grupo de tratamiento</u>					
Grupo de tratamiento	N.º de perros	Vacuna	Dosis y vía	Vacunación en días de estudio	Prueba en el día de estudio
1	8	Ninguno	Ninguno	Ninguno	42
2	8	Sí	1 ml por vía subcutánea	0 y 21	42

Aleatorización: Los perros se clasificaron por generación de un número aleatorio dentro de un bloque y a continuación se clasificaron con el ID de grupo unido. Los números aleatorios más bajos dentro de los bloques se asignaron al grupo 1 y los números aleatorios más altos se asignaron al grupo 2. Puesto que la pérdida de peso es

25

una de las manifestaciones clínicas asociadas con la infección de *E. canis*, los perros también se bloquearon por peso durante la aleatorización.

- 5 Estudio ciego: El personal que analizaba las muestras de laboratorio, y realizaba diariamente observaciones a los animales, evaluaciones clínicas y observaciones de necropsia no eran conscientes de las asignaciones de grupo de tratamiento hasta la finalización del estudio.

PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES:

- 10 Control/Aclimatación antes de la vacunación:

Muestras: Se recogieron muestras de sangre en tubos de separación de suero en el día de estudio 0 antes de la primera vacunación para el análisis de título de anticuerpos.

- 15 Examen físico: Todos los animales recibieron un examen físico el día -3 en las instalaciones de la prueba por el veterinario que acudió y se encontraron que estaban sanos y adecuados para el estudio.

Observaciones diarias: Durante el período de aclimatación, todos los animales se observaron diariamente por la plantilla de cuidados de animales.

- 20 Observaciones clínicas: Se registraron las manifestaciones clínicas y temperaturas rectales el día 0 y el día 21 antes de la vacunación.

Vacunación:

- 25 Administración del producto biológico: La vacuna se administró subcutáneamente, en una dosis de 1,0 ml, a cada animal los días 0 y 21 usando una jeringuilla de 3 ml y un calibre de 23 x 1 pulgada de aguja. Todas las vacunas se mantuvieron en hielo húmedo durante su transporte a las instalaciones de los animales y durante la administración de las vacunas. La vacunación subcutánea se realizó en la región supraescapular derecha para la primera dosis y la
- 30 región supraescapular izquierda para la segunda dosis.

Procedimientos después de la vacunación:

- 35 Reacciones en el lugar de la inyección: Se registraron observaciones del lugar de la inyección durante los 7 días siguientes de cada vacunación.

Observaciones diarias: Todos los animales se observaron diariamente durante el período después de la vacunación por la plantilla del cuidado de los animales.

- 40 Serología: En el día de estudio 21 se recogieron muestras de sangre en tubos de separación de suero para el análisis del título de anticuerpos.

Procedimientos antes de la prueba:

- 45 Observaciones clínicas: Las manifestaciones clínicas y las temperaturas rectales se tomaron en los días de estudio 35, 39 y 42 (antes de la prueba) para establecer valores de valor inicial.

- 50 Muestras de sangre: En el día de estudio 42 (antes de la prueba) se recogieron muestras de sangre en tubos de separación de suero para el análisis del título de anticuerpos. En los días 35, 39 y 42 (antes de la prueba) se recogieron muestras de sangre en tubos de EDTA para CBC de valor inicial. El día de estudio 42 (antes de la prueba) se recogió sangre en tubos de Genes PAX para análisis de RCP.

Se registraron los pesos corporales el día de estudio 42 (antes de la prueba) para los valores iniciales.

- 55 Prueba:

- 60 Material de prueba: Dos viales de material de prueba de *E. canis* (cultivo congelado de bajo pasaje sometido a pases en perros) se retiraron de nitrógeno líquido, se descongelaron rápidamente y diluyeron 1:100 (1ml + 99ml) en medio de Fischer. El material de prueba diluido se tapó, se invirtió a mezcla y a continuación se retiró 1ml para su valoración. El vial se selló con un tapón de aluminio, etiquetó y colocó sobre hielo en un recipiente secundario a prueba de derrames para su transporte a la unidad de animales.

- 65 Administración de la prueba: El día 42 todos los perros se sometieron a la prueba subcutáneamente con 2,0 ml de material de prueba diluido.

Confirmación/Valoración por retroceso de la prueba: Una muestra de material de prueba diluido se recogió y usó

para su valoración inmediata el día de la prueba en placas de cultivo de tejido de 24 pocillos.

Control de después de la prueba:

5 Pesos corporales: Se registraron los pesos corporales semanalmente después de la prueba.

Observaciones diarias: Se registraron las observaciones de los animales diariamente después de la prueba, excepto los días en los que se realizaban las observaciones clínicas y las temperaturas, hasta el día 49.

10 Observaciones clínicas: Desde el día de estudio 49 hasta el final del estudio, las manifestaciones clínicas (depresión, deshidratación, epistaxis y secreción nasal/ocular) se registraron diariamente y la registraron las temperaturas rectales dos veces a la semana.

15 Reacciones en el lugar de la inyección: Se realizaron observaciones del lugar de la inyección durante los 7 días siguientes después de la prueba.

Muestras de sangre:

20 Sangre para CBC: Se recogieron muestras de sangre (EDTA) dos veces a la semana después de la prueba para controlar los perfiles de CBC.

Sangre para la evaluación de PGR: La sangre se recogió semanalmente en tubos de genes PAX para el análisis de RCP.

25 Sangre para suero: Se sangraron los perros una vez cada dos semanas después de la prueba para la serología.

Necropsia/Disposición: Todos los animales de la prueba se sometieron a eutanasia humana mediante inyección intravenosa de Beuthanasia antes de la necropsia.

30 Recogida y manipulación de muestras:

Sangre EDTA para CBC: Se recogió sangre mediante venipunción de la vena yugular usando tubos de vacío que contiene tripotasio-EDT A. La sangre se envasó sobre envases de hielo y se procesó el mismo día para el análisis de perfil sanguíneo.

35 Sangre SST para análisis de anticuerpos: Se recogió sangre mediante venipunción de la vena yugular usando tubos de vacío. La sangre se centrifugó a 2500 RPM durante 10 minutos y el suero se marcó y almacenó a -10 °C o más frío.

40 Sangre para la evaluación de RCP: Se recogió sangre mediante venipunción de la vena yugular usando tubos de genes PAX de vacío y se realizó análisis de RCP.

MÉTODOS ANALÍTICOS:

45 Recuentos plaquetario: Los recuentos de plaquetas se determinaron según los procedimientos bien establecidos en la técnica.

50 Valoración de *E. canis*: Se evaluó una muestra de retención se material de prueba diluido. Brevemente, las células de MOP se prepararon en placas de 24 pocillo a una concentración de $1,0 \times 10^5$ células por ml y se incubaron a 36 ± 2 grados Celsius durante 1 día antes de realizar la prueba. El medio se retiró asépticamente de los cultivos de MOP de 1 día y se añadieron diluciones en serie de diez veces del material de prueba, 1 ml por pocillo, en 4 pocillos de réplica de la placa de 24 pocillos. Las placas se incubaron a 36 ± 2 grados Celsius durante 7 días. Después de 7 días, las placas se volvieron a alimentar con medio de cultivo fresco de Fischer, 1 ml por pocillo y se volvió a 36 ± 2 grados Celsius durante 7 días. Después de 14 días de incubación, las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 2000 rpm, el medio se aspiró y los cultivos se fijaron con 100 % de metanol (0,5 por pocillo) durante 10 minutos. Una vez las placas estaban secas, se añadieron 0,5 ml por pocillo de anticuerpo monoclonal de anti-*E.canis* de ratón (diluido en 1:1000 en 0,01M de PBS) y se incubaron durante 30 minutos a 36 ± 2 grados Celsius. Las placas se lavaron 3 veces en 0,01M de PBS con un lavado final en agua. A continuación, se añadieron 0,5 ml por pocillo de un IgG anti-ratón de cabra-FITC (diluido 1:100 en 0,01M de PBS) e incubaron durante 30 minutos a $36^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$. Las placas se lavaron de nuevo y observaron con un microscopio fluorescente. Los títulos se calcularon al 50 % de los puntos finales usando el método de Spearman-Karber.

65 Serología: Se usó un ensayo de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) para la detección de anticuerpo de anti-*E.canis* en suero de perro. Brevemente, las diluciones iniciales de 1:20 se suero se prepararon en tampón de dilución de suero. Las muestras únicas se diluyeron a 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320 a continuación se añadió (10µl por dilución) a un portaobjetos de 12 pocillos que contiene células de MOP infectadas con *E. canis* fijado y se incubó en

una cámara humificada durante 30 minutos a 36 ± 2 grados Celsius. Los portaobjetos se lavaron en 0,01M de PBS durante 10 minutos y 10 μ l de IgG anti-ratón de cabra-FITC (diluido en 1:100 en 0,01M de PBS) se añadió a cada pocillo sobre el portaobjetos. Los portaobjetos se colocaron a continuación en una cámara humidificada durante 30 minutos a 36 ± 2 grados Celsius, se lavó en 0,01M de PBS durante 10 minutos y se leyó mediante microscopio fluorescente. El título se determina mediante la dilución más elevada en la que la fluorescencia es visible.

RCP: la RCP se realizó sobre las muestras de sangre según los procedimientos bien establecidos en la técnica.

Prueba de inactivación: Se evaluó el antígeno inactivado con formol para comprobar la completa inactivación. Brevemente, Las células de MOP se prepararon en matraces de 150 cm² un día antes de la inoculación a $1,0 \times 10^5$ de células por ml y 60 ml por matraz. Se inoculó 1,0 ml de cada muestra de ensayo (incluyendo controles positivo y negativos) en los matraces y se incubó durante 8 días a 36 ± 2 grados Celsius. Se llevaron a cabo de pasajes en ciego, recibiendo cada pasaje 10 ml del inóculo del pasaje previo. A los 8 días después del pase 2 post-en ciego, cada material de matraz se tiñó mediante inmunofluorescencia específica. La falta de fluorescencia en cultivo es una indicación de inactivación completa.

ANÁLISIS DE DATOS:

Variables de resultado: La variable primaria para la determinación de la eficacia de la formulación de la vacuna se basó en la prevención de trombocitopenia grave en vacunados en comparación con los de control. Porcentaje de pérdida de peso, puntuación de necropsia total, valores en sangre y manifestaciones clínicas se consideraron que apoyaban la evidencia de protección.

Puntuación de observaciones clínicas: Las manifestaciones clínicas para cada perro se registraron y puntuaron diariamente durante el período de 12 semanas después de la prueba.

Guía de evaluación clínica: Al entrar en la sala de aislamiento, caminar a través para evaluar el comportamiento de los animales. La puntuación para la depresión puede determinarse en muchos animales durante este primer paseo. A continuación, proceder con las observaciones clínicas. A continuación, medir la temperatura corporal seguido por la obtención de las muestras de sangre requeridas.

Muerte: 100 puntos (sin signos vitales, incluyendo los perros que estaban moribundos y sometidos a eutanasia).

Depresión: Ausente (actividad y comportamiento normales). Presente: Letárgico, permanece en el suelo mientras que estás en la habitación y no quiere levantarse.

Secreción nasal: Normal (ausente); Grave (moderado a severo): Fluido claro, a menos acuoso, hasta abajo o por debajo de la boca - también a los lados de la nariz o abajo del surco nasal; Mucopurulenta (moderado a severo): Mucopurulenta, no clara, a menudo secreción con color hasta abajo o por debajo de la boca - también a los lados de la nariz o abajo del surco.

Secreción ocular: Normal (ausente); Grave (moderado a severo): Fluido claro, a menos acuoso, una mitad hasta abajo de la nariz o borde del ojo más o pelo agrupado o húmero en el borde interior o exterior del ojo; Mucopurulenta (moderado a severo): Mucopurulenta, no clara, a menudo una secreción con color una mitad hasta abajo de la nariz o borde del ojo más o pelo agrupado o húmero en el borde interior o exterior del ojo.

Epistaxis: (Sangrado de la nariz) - Normal (ausente); Presente: Sangrado de la nariz.

Deshidratación: Normal (ausente); Presente: Los pliegues de piel entre los hombros se pegan o tardan más de 3 segundos en retraerse.

Tabla 4

Sistema de puntuación para manifestaciones clínicas específicas	
Muerte	100
Estado de depresión	2
<u>Secreción nasal</u>	
Secreción grave	1
Secreción mucopurulenta	2
<u>Secreción ocular</u>	
Secreción grave	1
Secreción mucopurulenta	2

Epistaxis	2
Deshidratación	1

Cálculo de porcentaje de pérdida de peso: Cada perro se pesó antes de la prueba para determinar un peso de valor inicial. La pérdida de peso de cada perro se calculó semanalmente después de la prueba usando la siguiente fórmula: (peso de valor inicial - peso actual / peso de valor inicial) x 100 = % de pérdida de peso.

5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

Enfermedad concurrente: Un perro de control tuvo que ser tratado durante el estudio. El perro desarrolló una úlcera en su ojo izquierdo y el párpado se hinchó hasta cerrarse. Se evitaron los antibióticos para no afectar el estudio. La afección se descubrió un día en particular. En ese momento, el ojo se enjuagó con salina isotónica. Dos días después el perro recibió una inyección subcutánea de atropina, de forma local. Cinco días después de que se describiera la afección el perro se observó por el veterinario para que se recuperara completamente. La afección fue probablemente a causa de un traumatismo (rascado por otro perro) y no como resultado del producto de prueba del estudio o de la prueba.

15

Evaluación antes de la vacunación: Los perros se analizaron para la presencia de anticuerpos de *E. canis* antes de la vacunación. Todos los perros fueron encontrados que tenía un título de <40 cuando se evaluó por ensayo de anticuerpos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) (véase Tabla 5; día 42 es el día de la prueba). También se tomaron observaciones clínicas y temperaturas rectales antes de la vacunación. Se encontró que todos los perros estaban clínicamente normales.

20

Tabla 5

Sumario de serología promedio						
Grupo de tratamiento	Día 0	Día 21	Día 42	Día 56	Día 70	Día 84
Controles	<40	<40	<40	<40	≥ 147	≥ 320
Vacunados	<40	<40	≥ 123	≥ 104	≥ 207	≥ 207

Evaluación después de la vacunación:

25

Ninguno de los perros vacunados se observó que tuviera reacciones en el lugar de la inyección después de la vacunación. Todos los perros se observaron diariamente para los efectos secundarios asociados con la vacuna después de ambas vacunaciones. Ninguno de los perros mostró ninguna manifestación clínica adversa después de la vacunación.

30

Se tomaron muestras de sangre para la serología el día 21 después de la vacunación, inmediatamente después de la segunda vacunación. Los títulos se midieron usando diluciones dobles de suero sobre un portaobjetos de 12 pocillos recubierta con *E. canis* infectada con células de MOP. Las diluciones se iniciaron en 1:40. Ninguno de los perros en el grupo vacunado mostró un título por encima del fondo 1:40 después de una única dosis de vacuna (véase Tabla 5).

35

En el día 42, inmediatamente antes de la prueba, la ruptura de los títulos de anticuerpos de *E. canis* vacunados fue tal como sigue (véase también, Tabla 5):

Títulos < 40:	0 perros
Títulos = 80:	4 perros
Títulos = 160:	3 perros
Títulos > 320:	1 perro

40

Todos los perros de control sin vacunar permanecieron seronegativos (< 1:40) antes de la prueba.

Prueba: Todos los perros fueron sometidos a la prueba el día 42 del estudio mediante la dilución del material de prueba descongelado 1:100 en medio de Fischer y mediante la administración de 2 ml de prueba subcutáneamente a cada perro. El material de prueba se valoró en el momento de la administración a los perros y se encontró que tenía un título de $10^{3.2}$ TCID₅₀ por 2 ml de dosis.

45

Evaluación clínica después de la prueba:

Pérdida de peso asociada con la prueba: Se registraron los pesos corporales semanalmente después de la prueba. Los resultados se resumen en la Tabla 6.

50

Tabla 6

Pesos corporales promedio (Kg) después de la prueba									
	Basal	Sem. 1	Sem. 2	Sem. 3	Sem. 4	Sem. 5	Sem. 6	Sem. 7	Sem. 8
Grupo de tratamiento	Día 42	Día 49	Día 56	Día 63	Día 70	Día 77	Día 84	Día 91	Día 98
Controles	13,3	13,4	13,4	13,2	12,8	11,9	11,4	11,5	11,5
Porcentaje promedio de pérdida de peso					3,89 %	11,15 %	14,83 %	16,97 %	15,91 %
Vacunados	10,8	10,8	10,9	10,6	10,2	9,9	9,8	9,9	9,9
Porcentaje promedio de pérdida de peso					4,86 %	7,29 %	7,88 %	7,85 %	7,61 %

5 El porcentaje de pérdida de peso más alto se observó en los perros de control con un promedio de 16,97 % de reducción de peso corporal en las 7 semanas después de la prueba. Este también fue el punto en el que hubo la mayor diferencia entre los grupos de tratamiento ya que los vacunados solo experimentaron un descenso del 7,85 % de peso corporal. La pérdida de peso se examinó estadísticamente. Se definió como pérdida de peso grave el 15 % del peso corporal del perro. El ochenta y siete por ciento (7/8) de los perros de control tuvieron una pérdida de peso del 15 % de su peso corporal, en comparación con el 12 % (1/8) de los vacunados. Esta diferencia es extremadamente significativa ($p=0,0042$).

15 **Mortalidad:** Dos de ocho (25 %) de perros en el grupo de control se sometieron a eutanasia debido a la gravedad de las manifestaciones clínicas. Ninguno de los vacunados murió durante el ensayo. La eutanasia fue una decisión del veterinario basándose en las manifestaciones clínicas, pérdida de peso y valores de glóbulos rojos y electrolitos. El veterinario que acudió fue ciego a la designación de grupos. La diferencia fue de apoyo, pero no significativa debido a la baja cantidad de perros en el estudio ($p=0,2118$).

20 **Evaluación de recuento de sangre completo:** También se tomaron muestras de sangre en los días de estudio 35, 39 y 42 para establecer valores iniciales para los glóbulos blancos y rojos (WBC y RBC), hematocritos (HTC), hemoglobina (Hgb) y plaquetas. Todos los perros se encontraban en los intervalos normales para estas mediciones antes de la prueba de acuerdo con el Manual Veterinario Merck, octava edición [Merck and Co. Inc., Whitehouse Station, N.J., USA, (1998)].

25 Las muestras de sangre se recogieron dos veces a la semana después de la prueba. Los resultados de CBC incluyeron Glóbulos blancos (WBC), Glóbulos rojos, (RBC), Hemoglobina (Hgb), Hematocritos (Hct o volumen de concentrado celular) y plaquetas. Puesto que la *E. canis* tiene un efecto dramático tal sobre los valores en sangre, se desarrolló un sistema de puntuación que puntuaría la incidencia como "normal, anormal o clínicamente significativa (o grave). La Tabla 7 resume los valores usados en este estudio.

30 Tabla 7

Sumario de los resultados de las muestras de sangre				
	Unidades	Valores del perro (normal)	Valores anormales	Valores "graves" clínicamente significantes*
WBC	$\times 10^3/\mu\text{l}$	6 - 17	< 6,0	< 4,5 para múltiples días
RBC	$\times 10^6/\mu\text{l}$	5,5 - 8,5	< 5,5	$\leq 4,0$ para múltiples días
Hgb	g/dl	12 - 18	< 12	< 8 para múltiples días
Hct	%	37 - 55	< 37	≤ 28 para múltiples días
Plaquetas	$\times 10^3/\mu\text{l}$	200-900	< 200	< 150 para múltiples días
* Manual Veterinario Merck				

35 Los valores clínicamente significantes (o graves) se calculan aproximadamente como el 75 % del extremo inferior de los intervalos normales durante múltiples días. Los perros en este intervalo se observaron a menudo como que tienen manifestaciones clínicas que pueden estar directamente correlacionada con la deficiencia de los glóbulos rojos relacionados. Valores anormales son cualquier valor por debajo del nivel mínimo de normal.

40 **Plaquetas:** Los recuentos de plaquetas bajos son la primera manifestación clínica asociada con infecciones por rickettsias. Para este estudio, fue la variable primaria. La *E. canis* es particularmente buena en causar descensos muy graves en la cantidad de plaquetas en perros afectados. Todos los 8 (100 %) perros de control y 5/8 (63 %) de los vacunados desarrolló trombocitopenia (recuentos de plaquetas < 200.000/ μl). La Figura 5 muestra los recuentos

de plaquetas promedio (control frente a vacunado) después de la prueba y la Tabla 8 proporciona un resumen de los datos. Los perros que tenían recuentos de plaquetas inferiores a 150.000 plaquetas/ μ l de sangre para dos o más lectura se consideraron que estaban en la categoría grave y se encontraban en un alto riesgo de sangrado al herirse. Los trabajadores al cuidado de los animales podían identificar fácilmente estos perros ya que la herida asociada con los sangrados de la venipunción persiste durante una cantidad de tiempo considerable después de que se haya tomado la muestra. En los perros de control, 6 de 8 (75 %) tenía recuentos de plaquetas en la categoría de grave. Solo 2/8 (25 %) de los vacunados tenía recuentos en la categoría de grave. Estadísticamente, esta diferencia no era significativa ($p = 0,0768$). Sin embargo, la mortalidad en al menos un perro de control censuró los datos ya que el perro murió prematuramente en el estudio ya que mostraba una trombocitopenia grave. Si no hubiera muerto el perro, el estudio hubiera concluido con que al menos 7/8 de controles mostraron trombocitopenia grave. Puesto que la mortalidad es una manifestación clínica mucho más grave que la trombocitopenia, la variable primaria se reanalizó como trombocitopenia o mortalidad. Teniendo en cuenta la mortalidad, la diferencia entre los de control y los vacunados se vuelve significativa ($p=0,0213$)

Tabla 8

Sumario de los resultados de plaquetas			
Clasificación	Leve	Anormalmente bajo*	Clínicamente significativa
	Porcentaje de perros con trombocitopenia tal como se describe por el Protocolo (< 50 % de recuento de periodo inicial)	Porcentaje de perros con plaquetas < 200*	Porcentaje de perros con plaquetas ≤ 100 durante más de un día
Controles	100 % (8/8)	100 % (8/8)	75 % (6/8)
Vacunados	63 % (5/8)	63 % (5/8)	25 % (2/8)

* Tal como se define por el Manual Merck como Trombocitopenia

Glóbulos rojos: La Figura 2 muestra los recuentos de eritrocitos promedio durante el periodo después de la prueba. La Figura 2 muestra que el promedio de los perros de control fue inferior a lo normal durante la mayoría del periodo de prueba, en el que el promedio de los vacunados permaneció en el intervalo normal durante la mayoría del periodo de prueba. La tabla 9 ilustra la gravedad de la prueba según el 100 % de los perros de control cumplió la definición del Manual Merck de anémicos y el 63 % progresó a una categoría grave. Ninguno de los perros vacunados progresó a una categoría severa de anemia. Esta diferencia es muy significativa ($p =0,0081$).

Tabla 9

Sumario de los resultados de RBC		
Clasificación	Anormalmente bajo*	Clínicamente significativa
	Porcentaje de perros con recuento de RBC < $5,5 \times 10^6/\mu$ l	Porcentaje de perros con RBC $\leq 4,0 \times 10^6/\mu$ l durante más de un día
Controles	100 % (8/8)	63 % (5/8)
Vacunados	50 % (4/8)	0 %

* Tal como se define por el Manual Merck como anémico

Glóbulos blancos: La Figura 1 resume los resultados de los recuentos de leucocitos durante el periodo después de la prueba. La Figura 1 muestra una disminución grave en el recuento de glóbulos blancos que se observó en los controles. Los datos se resumen mejor en la Tabla 10 en la que se observa una diferencia marcada para leucopenia tanto leve como grave en los perros. Un 38 % de los perros en el grupo de control progresó a la categoría "grave" de leucopenia en la que ninguno de los vacunados lo hizo. Esta diferencia no es significativa ($p =0,0822$). La tabla 10 y la Figura 1 ilustran la diferencia entre los promedios para los vacunados y los controles. El promedio de los controles cae por debajo del nivel mínimo para normal en el que el promedio de los vacunados no lo hizo. Esta tendencia sugiere que con más animales que cada grupo de estudio, es probable que la diferencia sea significativa.

Tabla 10

Sumario de los resultados de WBC		
Clasificación	Anormalmente bajo*	Clínicamente significativa
	Porcentaje de perros con recuento de WBC < 6 x 10 ³ /µl	Porcentaje de perros con recuento de WBC :S4.5 x 10 ³ /µl durante más de un día
Controles	88 % (7/8)	38 % (3/8)
Vacunados	50 % (4/8)	0 %

* Tal como se define por el Manual Merck como Leucopénico

Valores de hemoglobina: La Figura 3 resume los resultados de las mediciones de hemoglobina durante el periodo después de la prueba. En consistencia con otros parámetros sanguíneos, la Figura 3 muestra que el promedio de los controles descendió muy por debajo de los valores mínimos para la mayoría del periodo de prueba. El promedio del grupo de vacunados nunca descendió por debajo de lo normal. La tabla 11 muestra que el 100 % de los perros de control tenían valores de hemoglobina bajos, en los que solo el 50 % de los vacunados descendió a este nivel. Ninguno de los vacunados progresó a la categoría severa para los niveles de hemoglobina. Sin embargo, solo el 25 % de los controles progresó a la categoría grave y esta diferencia no fue significativa (p = 0,2118).

Tabla 11

Sumario de los resultados de hemoglobina		
Clasificación	Anormalmente bajo*	Clínicamente significativa
	Porcentaje de perros con valores Hgb < 12 g/dl	Porcentaje de perros con valores Hgb ≤ 8 g/dl durante más de un día
Controles	100 % (8/8)	25 % (2/8)
Vacunados	50 % (4/8)	0 %

* Tal como se define por el Manual Merck como anémico

Porcentajes de hematocritos: La Figura 4 resume los resultados de los valores de hematocritos después de la prueba. Como con las otras mediciones de anemia, la Figura 4 muestra que el promedio de control funcionó bien por debajo de lo normal durante la primera mitad del periodo de prueba, en el que el promedio de perros vacunados nunca desciende por debajo de lo normal. La tabla 12 muestra que la vacunación de perros con el producto de prueba disminuyó la incidencia de anemia, según se midió mediante los recuentos de hematocritos, a la mitad. El sesenta y tres por ciento (5/8) de los perros de control progresó a la categoría grave para los hematocritos en los que solo 1/8 de los perros en el grupo vacunado (13 %) tuvo un valor grave. Esta diferencia estuvo muy cerca de la significación (p =0,0534).

Tabla 12

Sumario de los resultados de hematocritos		
Clasificación	Anormalmente bajo*	Clínicamente significativa
	Porcentaje de perros con valores Hct < 37 %	Porcentaje de perros con valores Hct ≤ 28 % durante más de un día
Controles	100 % (8/8)	63 % (5/8)
Vacunados	50 % (4/8)	13 % (1/8)

* Tal como se define por el Manual Merck como anémico

Manifestaciones clínicas: Cada perro se observó diariamente para manifestaciones clínicas indicativas de una infección grave. Los resultados se resumen en la Tabla 13. La puntuación de manifestaciones clínicas se basó en observaciones realizadas por personal cegado que observaba los perros por síntomas de depresión, secreción nasal, secreción ocular, epistaxis, deshidratación y muerte. Se asignó una puntuación a cada observación en relación a la gravedad de la manifestación clínica. La puntuación total del grupo de control fue de 254 frente a 28 de los vacunados. La puntuación promedio para los controles frente a los vacunados fue de 32 y 4, respectivamente. A pesar de parecer muy indicativo de protección, la diferencia entre los grupos no fue significativa (p=0,4364).

Tabla 13

Sumario de puntuaciones clínicas			
Grupo	Puntuación total	Promedio	Mediana
Controles	254	32	5
Vacunados	28	4	1

5 Temperaturas rectales: Se tomaron las temperaturas rectales y se registraron dos veces a la semana. Los perros se consideraron con fiebre si la temperatura era de >39.5 grados Celsius. Esto es consistente con el Manual Veterinario Merck, que establece el intervalo de temperatura normal como 38,9 ± 0,5 grados Celsius. La *E. canis* es conocida por causar repuntes de temperatura en los perros afectados. Las observaciones de este estudio son consistentes con esto y se resumen en la Tabla 14. El 87,5 % (7/8) de los controles tuvieron picos de temperatura en comparación con el 50 % (4/8) de los vacunados. Los picos de fiebre se compararon estadísticamente por sus diferencias. Un veinticinco por ciento (2/8) de los controles tenían fiebre durante dos o más días mientras que solo 10 un 12,5 % (1/8) de los vacunados tenía. Esta diferencia no era significativa (p = 0,6709).

Tabla 14

Sumario de temperaturas rectales		
Grupo	Porcentaje de perros con fiebre	Porcentaje de perros con fiebre múltiples días
Controles	87,5 % (7/8)	25 % (2/8)
Vacunados	50 % (4/8)	12,5 % (1/8)
* Fiebre definida como una temp. rectal de ≥ 39.5° C		

15 Reacción en el lugar de inyección de la prueba: Se observaron los perros para la reacción en el lugar de la prueba. Ninguno de estos 16 perros en ni en el grupo de vacunados ni en el grupo de control mostró ningún síntoma de reacción en el lugar de la administración de la prueba.

20 Resultados de detección de RCP de *E. canis* en la sangre: Se tomaron las muestras de sangre para el análisis de RCP para determinar la infección de *E. canis* inmediatamente antes de la prueba. Los resultados de RCP se muestran en la Tabla 15. Como se esperaba, todos los perros permanecieron negativos para la infección de *E. canis* antes de la prueba. Los resultados para el análisis RCP semanal de la sangre para infección de *E. canis* después de la prueba se encuentran en la Tabla 15. Todos los perros de control fueron positivos de *E. canis* en la sangre en más de un punto de tiempo. La RCP nunca detectó *E. canis* en tres de los vacunados. Estos resultados coinciden exactamente con los resultados de las plaquetas ya que estos mismos perros no desarrollaron trombocitopenia 25 después de la prueba. La diferencia entre los de control y los vacunados por un resultado positivo no fue significativa (p = 0,0822).

Tabla 15

Porcentaje de animales infectados con <i>E. canis</i> después d la prueba basándose en la RCP										
		Sem. 1	Sem. 2	Sem. 3	Sem. 4	Sem. 5	Sem. 6	Sem. 7	Sem. 8	
Grupo de tratamiento		Día 42	Día 49	Día 56	Día 63	Día 70	Día 77	Día 84	Día 91	Día 98
Controles	% de positivos	0 %	0 %	0 %	50 %	88 %	100 %	100 %	75 %	75 %
Vacunados	% de positivos	0 %	0 %	0 %	50 %	63 %	63 %	63 %	50 %	63 %

30 Serología después de la prueba: La serología se realizó cada dos semanas después de la prueba. Los resultados de la serología para los perros vacunados responden la pregunta de si los perros en este grupo que fueron negativos por RCP y no desarrollaron manifestaciones clínicas incluyendo trombocitopenia después de la prueba estuvieron realmente expuestos a *E. canis*. En algún punto del pasado día 42 (día de la prueba) los tres perros tuvieron un rápido aumento en el título, indicando una exposición al material de prueba. Se muestra un resumen de los medios para la serología en la Tabla 5. La relevancia del título de anticuerpos para la protección no queda clara en este estudio. La serología no parece ser un buen indicador de exposición a *E. canis* virulenta. 35

40 Puntuaciones de necropsia: Se llevaron a cabo necropsias en todos los perros en el momento de la eutanasia y las personas que realizaron las necropsias lo hacían en ciego. Para la mayoría de los perros, esto ocurrió a las ocho semanas después de la prueba. Para los perros que se tuvieron que someter a eutanasia prematuramente, debido a

manifestaciones clínicas graves, las necropsis se realizaron en el momento de la muerte. Los perros se sometieron a necropsis y puntuaron inmediatamente después de la eutanasia. La esplenomegalia es una observación que puede asociarse claramente con la infección de *E. canis*. El estado de vacunación pareció tener un efecto sobre las observaciones de la esplenomegalia (Tabla 16). Ninguno de los perros vacunados tenía esplenomegalia en comparación con el 38 % (3/8) de los de control. Esta diferencia no fue significativa (0,0822). En los perros que tuvieron que someterse a eutanasia antes del final del ensayo de 8 semanas, el veterinario que los atendía observó que había un hallazgo consistente de acumulación de fluido abdominal. Puesto que bajos niveles de sueroalbúmina llevaban a un desequilibrio osmótico entre la circulación y los tejidos, podía resultar en una acumulación de fluidos en la cavidad abdominal. Para el recordatorio del periodo de prueba, se ordenaron los paneles químicos para que se llevaran a cabo sobre las muestras de sangre bi-semanalmente que se enviaban para su evaluación. Los resultados de estas pruebas para los niveles de albumina se resumen en la Tabla 17. La mitad de los controles (4/8) tuvieron una acumulación significativa de fluido en la cavidad abdominal observada en la necropsia. De los controles que tuvieron acumulación de fluidos, el 50 % de ellos tuvieron una puntuación grave de más de 200 ml de fluido recuperado. Ninguno de los vacunados tuvo ninguna acumulación de fluidos (Tabla 16). Esta diferencia no era significativa ($p = 0,2118$). Hubo una correlación interesante con los niveles de sueroalbúmina y recuentos de plaquetas. Todos los perros que desarrollaron trombocitopenia tuvieron valores de albumina por debajo de lo normal. El estado de vacunación pareció aclarar el efecto de los niveles de sueroalbúmina con 6/8 de controles (75 %) descendiendo por debajo del 75 % del valor mínimo para la concentración de albumina en el suero donde solo 3/8 (25 %) de los vacunados descendió a este nivel (Tabla 17).

Tabla 16

Sumario de los hallazgos en la necropsia						
Aspecto externo	Fluido abdominal	Bazo	Pulmones	Estómago	Colon descendiente	"Puntuación de necropsia total"
Porcentaje de perros de control afectados						
38 %	50 %	38 %	13 %	38 %	0 %	26
Porcentaje de perros vacunados afectados						
25 %	0 %	0 %	13 %	50 %	38 %	18
# Puntuación de necropsia total para los 8 animales en cada grupo						

Tabla 17

Sumario de resultados de sueroalbúmina		
Clasificación	Anormal	Clínicamente significativa
	Porcentaje de perros con sueroalbúmina < 2,5 %*	Porcentaje de perros con sueroalbúmina < 1,9 más de un día
Controles	100 % (8/8)	50 % (4/8)
Vacunados	75 % (6/8)	38 % (3/8)
* Tal como se define por el Manual Merck como el límite más bajo		
** "Clínicamente significativa" se define como el 75 % del valor mínimo durante más de un día		

Tabla de sumario de todos los resultados: Para evaluar y capturar la gravedad de todos estos resultados complejos, se ha creado una tabla de sumario (Tabla 18). En esta tabla, solo las puntuaciones clínicamente significantes (graves) se examinan para cada parámetro medido en este ensayo. La puntuación de severidad promedia para los controles es de 14,6 en comparación con 3,5 para los vacunados. Esta dramática diferencia subraya la eficacia del producto de prueba en todos los vacunados frente a los de control.

CONCLUSIONES:

La prueba fue eficaz y más potente que lo planeado ya que el 100 % de los controles desarrolló trombocitopenia, títulos más altos a *E. canis*, manifestaciones clínicas graves, pérdida de peso y dos de los perros tuvieron que someterse a eutanasia.

Cuando se tiene en cuenta la censura debido a la mortalidad, la incidencia de trombocitopenia grave, la variable primaria, demostró ser inferior en los vacunados que en los de control y esa diferencia fue significativa ($p = 0,0213$).

La vacunación pareció tener un efecto sobre la mortalidad ya que los 25 % de los controles y ninguno de los vacunados tuvo que someterse a eutanasia por razones humanas después de la prueba.

Se experimentó una pérdida de peso grave por los perros en el grupo de control con algunos perros perdiendo casi el 25 % de su peso corporal durante las ocho semanas después de la prueba. La incidencia de pérdida de peso grave fue inferior en los vacunados que en los de control y esa diferencia fue extremadamente significativa ($p = 0,0042$).

5 La diferencia entre los vacunados y los de control por otros parámetros sanguíneos que alcanzaron niveles graves pero no fueron lo suficientemente significantes aunque algunos estuvieron muy cerca. Estos incluían WBC ($p = 0,08221$), hematocritos ($p = 0,0534$), y hemoglobina ($p = 0,2118$).

10 La detección por RCP de *E. canis* en la sangre coincidió de forma precisa los resultados conseguidos para la incidencia de trombocitopenia.

Tres de los perros en el grupo de control nunca mostró ninguna manifestación clínica de infección o tuvo un nivel detectable de *E. canis* en la sangre mediante RCP. Sin embargo, la serología indicó que estos tres perros parecieron tener una respuesta anamnésica a la *E. canis* después de la prueba, indicando que estuvieron expuestos a material de prueba virulento.

15 La acumulación de fluidos en el abdomen como resultada de deficiencia de albúmina grave en la sangre solo se observó en los perros de control y no en los vacunados.

20 Las manifestaciones clínicas entre las que se incluye depresión, secreción nasal, secreción ocular, epistaxis, deshidratación y muerte fueron las más graves en los perros de control en comparación con los vacunados, sin embargo, las diferencias no fueron lo significativamente distintas entre los grupos ($p = 0,4364$).

25 Los picos de temperatura rectal después de la prueba fueron más comunes en los perros de control.

Ninguna de las inyecciones de vacuna o de prueba produjo ninguna reacción observable sobre los perros.

Tras la necropsia, la observación de esplenomegalia solo se observó en los de control.

30 Estos resultados apoyan la eficacia de la vacuna de la presente invención.

Tabla 18

Sumario de todos los resultados en la categoría de grave													
Grupo de tratamiento	Pérdida de peso	WBC	RBC	PCV	Hemoglobina	Plaquetas	Mortalidad	Fiebre	Fluido abdominal	Esplenomegalia	Albúmina	RCP +/-	"Puntuación total
Controles	21	9	15	15	6	18	Sí	4	6	3	12	8	117
Vacunados	3	0	0	3	0	6	No	2	0	0	9	5	28
Pérdida de peso- > 15% de peso corporal =3 Hemoglobina -dos o más días ≤8 g/dl =3 Esplenomegalia -sí= 1 WBC-dos o más días ≤ 4,5 x 10 ³ /µl= 3 Plaquetas-dos o más días ≤ 100 x 10 ³ /µl= 3 Albúmina -dos o más días ≤1,9 g/dl =3 RBC -dos o más días ≤ 4,0x 10 ⁶ /µl= 3 Fiebre -Temp ≥39,5 dos o más días = 2 RCP= positiva en cualquier momento durante el estudio = 1 Hematocrit/PCV -dos o más días ≤ 28%= 3 Fluido abdominal - > 200 ml = 3 # Puntuación total para los 8 animales en cada grupo													

5 Debe comprenderse que esta invención no se limita a las configuraciones particulares descritas, etapas de proceso y materiales descritos en el presente documento como tales configuraciones, las etapas de proceso y materiales pueden variar de algún modo. También debe comprenderse que la terminología empleada en el presente documento se usa para los fines únicamente de descripción de las realizaciones particulares y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención está limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas y equivalentes de las mismas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de vacuna **caracterizada por que** la vacuna comprende un disolvente no polar que comprende un adyuvante lipofílico y **por que** comprende una cantidad inmunizante eficaz de un antígeno inactivado de E. canis asociada a células; en donde el antígeno provoca una respuesta inmune protectora, pero provoca una respuesta humoral mínima en un sujeto cuando la vacuna se administra como una vacuna primaria; en donde el antígeno se genera a partir de E. canis sometido a pases sobre una célula canina, en donde el adyuvante comprende 6,6' dimicolato de trehalosa y en donde el disolvente no polar es un sistema de disolventes de cloroformo que comprende un 65-95 % de cloroformo volumen/volumen y un 5,0-30 % de metanol volumen/volumen.
- 10 2. La composición de vacuna de la reivindicación 1, en la que la célula canina es una célula de médula ósea de perro.
- 15 3. La composición de vacuna de la reivindicación 2, en la que la célula de médula ósea de perro tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-10545.
4. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el antígeno está inactivado con formol.
- 20 5. La vacuna de la reivindicación 1 en la que el sistema de disolventes de cloroformo comprende aproximadamente el 90 % de cloroformo: 10 % de metanol: 1,0 % de agua volumen a volumen, respectivamente.
6. Una E. canis asociada a células que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-10546.
- 25 7. Una célula que tiene el n.º de referencia de ATCC PTA-10545.
8. La composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en la protección de un cánido contra E. canis.
- 30 9. Un proceso para la producción de la composición de vacuna de cualquiera de las reivindicaciones 1-5 que comprende el cultivo de E. canis sobre una célula canina para producir el antígeno; y a continuación mezclar el antígeno con un excipiente veterinariamente adecuado.
- 35 10. Un proceso para la producción de un antígeno de E. canis que comprende el cultivo de E. canis sobre la célula de la reivindicación 7 para producir el antígeno.

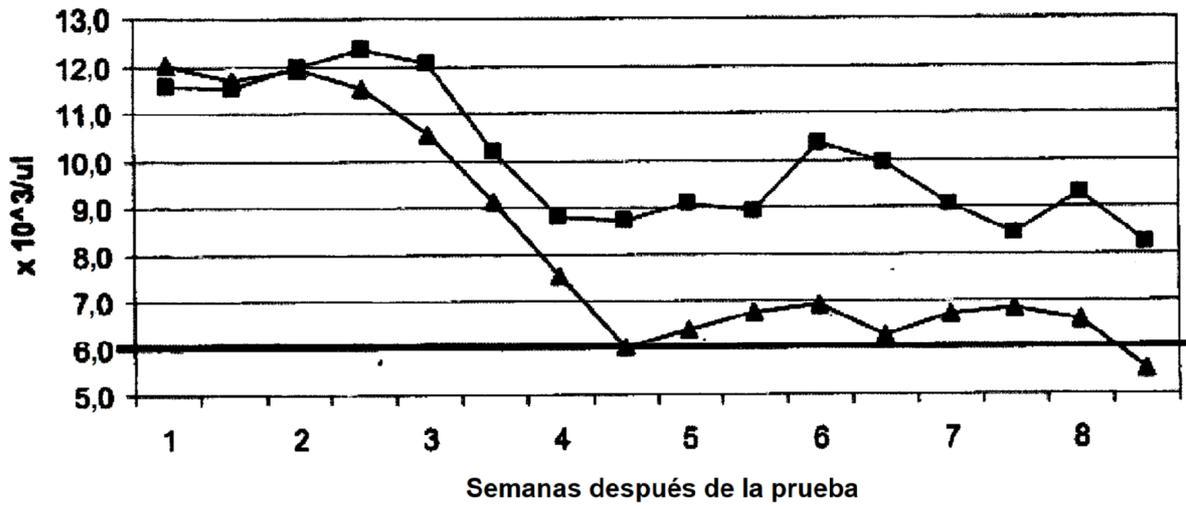


FIG. 1

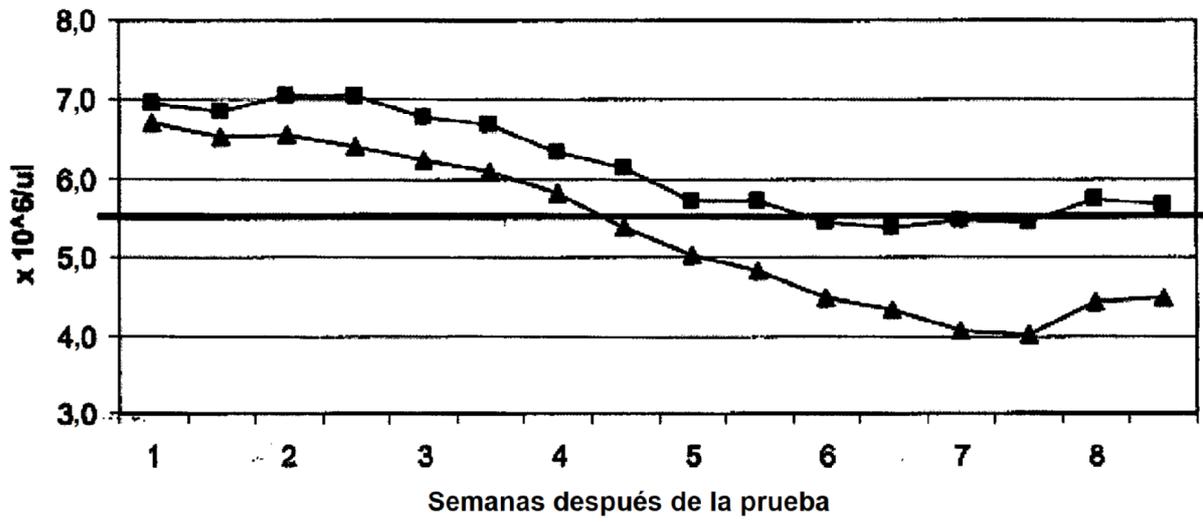


FIG. 2

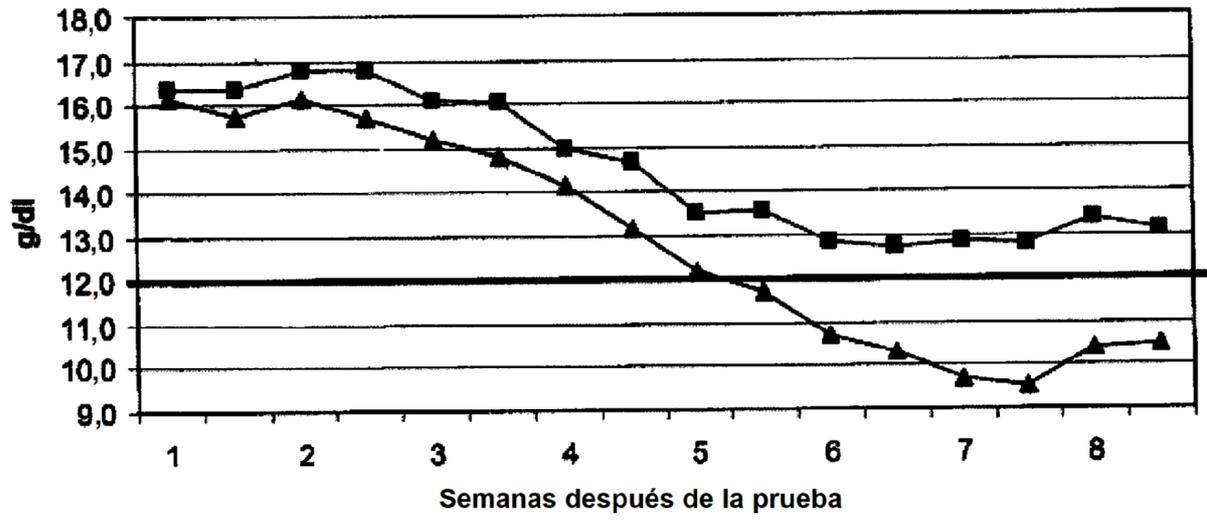


FIG. 3

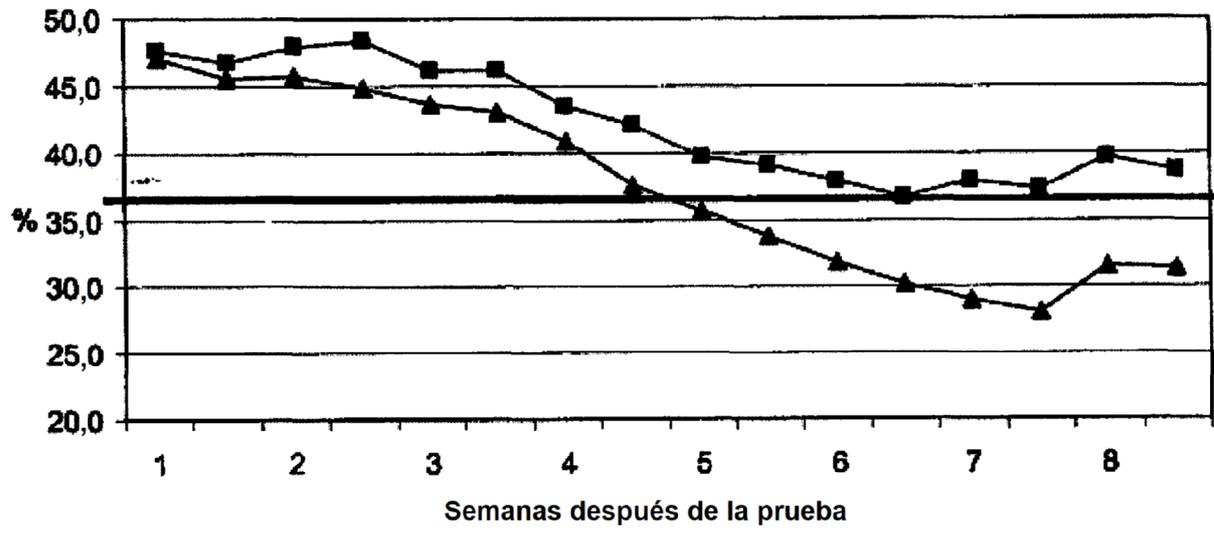


FIG. 4

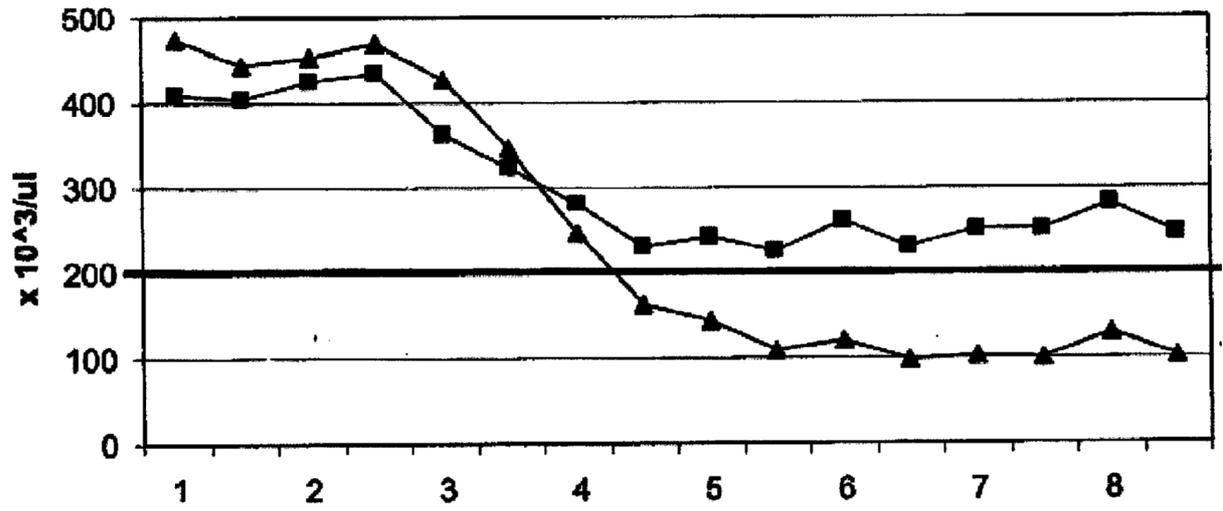


FIG. 5