

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 205**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/215** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2013 PCT/US2013/042590**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181086**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2013 E 13729146 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 2854847**

54 Título: **Vacunación con coronavirus respiratorio canino para protección contra infecciones por B. Bronchiseptica**

30 Prioridad:

**31.05.2012 US 201261653558 P**

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

**13.03.2020**

73 Titular/es:

**ZOETIS SERVICES LLC (100.0%)  
10 Sylvan Way  
Parsippany, NJ 07054, US**

72 Inventor/es:

**SHIELDS, SHELLY LYNN y  
ABDELMAGID, OMAR YOUSIF**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 748 205 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

Vacunación con coronavirus respiratorio canino para protección contra infecciones por B. Bronchiseptica

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere al campo de la inmunología, y en particular al campo de las composiciones inmunogénicas y de vacuna. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a composiciones que comprenden Coronavirus Respiratorio Canino (CRCoV) para su uso como vacuna para la prevención de enfermedades bacterianas que comprenden Bordetella bronchiseptica, en un perro.

**Antecedentes de la invención**

10 El CRCoV es una infección respiratoria altamente contagiosa que se transmite por contacto directo de perro a perro, aerosoles de secreciones respiratorias y contacto con ambientes o personas contaminados. Algunos perros tienen una enfermedad leve con síntomas que consisten en tos, estornudos y secreción nasal, mientras que otros perros tienen una infección subclínica sin signos clínicos, pero arrojan virus que pueden infectar a otros perros. Los perros infectados con CRCoV pueden progresar a neumonía, en particular si se coinfectan con otros patógenos respiratorios.

15 Los perros infectados con múltiples patógenos respiratorios, en particular patógenos tanto virales como bacterianos, pueden contraer el complejo de enfermedades respiratorias infecciosas caninas (CIRDC), que es una enfermedad multifactorial altamente contagiosa común en perros alojados en condiciones de hacinamiento, tales como centros de reubicación y perreras de embarque o entrenamiento. Los patógenos respiratorios observados en perros infectados con CIRDC incluyen la bacteria *Bordetella bronchiseptica* (Bemis et al., Lab. Anim. Sci., 29:48-52, 1977), coronavirus respiratorio canino (CRCoV) (Erles et al., Virology, 310(2):216-223, 2003), virus de la gripe canina (CIV) (Crawford et al., Science, 310(5747):482-485, 2005), virus de parainfluenza canina (CPIV) (Binn et al., Exp. Biol. Med., 126:140-145, 1967), *Mycoplasma cynos* (Chalker et al., Microbiology, 150:3491-3497, 2004), y adenovirus canino serotipo 2 (CAV-2) (Ditchfield et al., Can. Vet. J., 3:238-247, 1962). El documento WO2011/112593 divulga una vacuna CIV y el uso de la misma en el procedimiento para proteger un canino contra *S. equi*. Hasta la fecha, no ha surgido ninguna vacuna contra todos, o la mayoría, de los patógenos mencionados anteriormente.

20 La protección contra CIRDC y otras enfermedades multipatógenas se ha centrado tradicionalmente en la administración de una vacuna combinada que incluye inmunógenos dirigidos contra cada uno de los patógenos potenciales.

**Sumario de la invención**

25 La presente invención sorprendentemente logra lo que se buscaba previamente en un producto multivalente a través de la administración de un solo antígeno. Específicamente, al administrar el coronavirus respiratorio canino (CRCoV), los solicitantes han demostrado una reducción en el estado de la enfermedad asociado con patógenos no CRCoV, a saber, *Bordetella bronchiseptica*. Esto permite tanto la reducción de un estado complejo de enfermedad multifacética con una sola composición monovalente y/o un aumento de la inmunogenicidad y la potenciación de la eficacia contra patógenos bacterianos en una composición multivalente.

30 De acuerdo con lo anterior, un aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende coronavirus respiratorio canino (CRCoV) para su uso como vacuna para la prevención de una enfermedad bacteriana, en la que la enfermedad bacteriana es causada por *Bordetella bronchiseptica*. En otra realización, la composición comprende además un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 En otra realización, la composición comprende además uno o más inmunógenos adicionales. Más en particular, el uno o más inmunógenos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en virus de parainfluenza canina (CPIV), adenovirus-2 canino (CAV-2) y virus de gripe canina (CIV). En otra realización, el uno o más inmunógenos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en virus del moquillo canino (CDV), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino entérico (CCV), adenovirus canino, *Leptospira* serovars, en particular, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, y *Leptospira Bratislava*, virus del herpes canino, pneumovirus canino, organismos *Leishmania*, una especie *Borrelia* (spp.), especie *Mycoplasma*, rabia, *Ehrlichia canis*, *Bordetella bronchiseptica* y cualquier combinación de los mismos. En otra realización, la composición consiste esencialmente en CRCoV y no en inmunógenos adicionales.

40 En otra realización, la composición tiene una duración de eficacia contra la enfermedad bacteriana durante un período de al menos 3 meses, o al menos 6 meses, o al menos 12 meses.

Otra realización de la invención proporciona una composición que comprende coronavirus respiratorio canino (CRCoV) para su uso como vacuna para la prevención de la enfermedad respiratoria canina en un perro causado por infecciones bacterianas, en la que la infección bacteriana es de *Bordetella bronchiseptica*.

Otra realización de la invención proporciona coronavirus respiratorio canino (CRCoV) para su uso como vacuna para la prevención de una enfermedad respiratoria canina multifactorial en un perro causada por infecciones por virus y bacterias mixtas mediante la administración del coronavirus respiratorio canino (CRCoV) al perro, en la que la infección bacteriana es causada por *Bordetella bronchiseptica*.

- 5 Como se describe en la presente memoria, la invención implica tratar una enfermedad causada por *Bordetella bronchiseptica* en un perro, administrando una composición que comprende coronavirus respiratorio canino (CRCoV) al perro.

También como se describe en la presente memoria, la eficacia de una composición que comprende un antígeno bacteriano se puede potenciar en un perro coadministrando coronavirus respiratorio canino (CRCoV) al perro. De este modo, otra realización de la invención proporciona un coronavirus respiratorio canino (CRCoV) para su uso en el aumento de la inmunogenicidad de una composición que comprende un antígeno bacteriano para su uso como vacuna para la prevención de infecciones bacterianas en un perro coadministrando el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) al perro, en el que el antígeno bacteriano es *Bordetella bronchiseptica*. En cualquiera de los anteriores, el antígeno bacteriano es de *Bordetella bronchiseptica*.

15 En el presente documento también se divulga un procedimiento o uso de la composición inmunogénica de una cualquiera de las realizaciones anteriores para la prevención del complejo de enfermedades respiratorias infecciosas caninas (CIRDC), en el que la composición previene la infección de una pluralidad de patógenos respiratorios caninos. La administración parenteral de una composición inmunogénica como se divulga en la presente memoria también se proporciona en la presente memoria.

20 La fabricación de un medicamento que comprende la composición inmunogénica para la prevención de la infección por un patógeno respiratorio canino en un perro también se divulga en la presente memoria.

Estas y otras realizaciones, características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas expuestas en la presente memoria a continuación. Se entiende que cada una de las realizaciones anteriores y siguientes se puede combinar en una sola realización.

## 25 Descripción detallada de la invención

Las siguientes definiciones se aplican a esta divulgación. Reemplazan cualquier definición contradictoria. Las palabras no definidas tienen el significado comúnmente usado por un experto en el arte. Además, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular.

30 "Acercas de" o "aproximadamente", cuando se usa en relación con una variable numérica medible, se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que están dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del intervalo de confianza del 95% para la media), o dentro del 10 por ciento del valor indicado, lo que sea mayor. Si se usa "aproximadamente" en referencia a intervalos de tiempo en semanas, "aproximadamente 3 semanas" es de 17 a 25 días, y "aproximadamente 2 a aproximadamente 4 semanas" es de  
35 10 a 40 días.

"Adyuvante", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier sustancia que sirve como un estimulador no específico de la respuesta inmune. Véase a continuación una descripción adicional de los adyuvantes.

40 El término "animal", como se usa en la presente memoria, incluye cualquier animal que sea susceptible a la infección por CRCoV y/o complejo de enfermedades respiratorias caninas, incluidos mamíferos, tanto domesticados como salvajes. Preferiblemente, animal como se usa en la presente memoria se refiere a un perro.

"Anticuerpo", como se usa en la presente memoria, es cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión a antígeno independientemente de la fuente, procedimiento de producción u otras características. Se refiere a una molécula de inmunoglobulina o un fragmento de la misma que se une específicamente a un antígeno como resultado de una respuesta inmune a ese antígeno. Las inmunoglobulinas son proteínas séricas compuestas de cadenas de polipéptidos "ligeras" y "pesadas" que tienen regiones "constantes" y "variables" y se dividen en clases (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM) en base a la composición de las regiones constantes. Un anticuerpo que es "específico" para un antígeno dado indica que las regiones variables del anticuerpo reconocen y se unen a un antígeno específico exclusivamente. El término incluye, pero no se limita a: un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoespecífico, un anticuerpo poliespecífico, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo tetramérico, un anticuerpo tetravalente, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo de cadena única, un anticuerpo específico de dominio, un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo con dominio eliminado, una proteína de fusión, una proteína de fusión ScFc, un anticuerpo de cadena única, anticuerpo quimérico, anticuerpo sintético, anticuerpo recombinante, anticuerpo híbrido, anticuerpo mutado y anticuerpos injertados con CDR. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes, o pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas.

Un "anticuerpo" se puede convertir en una proteína de unión a antígeno, que incluye, pero no se limita a, fragmentos de anticuerpos que incluyen pero no se limitan a: Fab, F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento Fab', un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena única (ScFv), un fragmento Fd, un fragmento dAb, diacuerpos, un péptido CDR3, un péptido FR3-CDR3-FR4 restringido, un nanocuerpo, un nanocuerpo bivalente, un inmunofarmacéutico modular pequeño (SMIP) y un minicuerpo y cualquiera de los fragmentos mencionados anteriormente y sus equivalentes manipulados química o genéticamente, así como otros fragmentos de anticuerpos que retienen la función de unión al antígeno. Por lo general, tales fragmentos comprenderían un dominio de unión a antígeno. Como reconocerán los expertos en el arte, cualquiera de tales moléculas puede ser modificada (por ejemplo, "germinada") para disminuir su inmunogenicidad, aumentar su afinidad, alterar su especificidad o para otros fines.

"Antígeno" o "inmunógeno", como se usa en la presente memoria, se refiere a una molécula que contiene uno o más epitopos (lineal, conformacional o ambos) que al exponerse a un sujeto inducirá una respuesta inmune que es específica para ese antígeno. Un epitopo es el sitio específico del antígeno que se une a un receptor de células T o un anticuerpo específico, y por lo general comprende aproximadamente 3 residuos de aminoácidos a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos. El término antígeno se refiere a antígenos de subunidad, antígenos separados y discretos de un organismo completo con el que el antígeno está asociado en la naturaleza, así como bacterias, virus, hongos, parásitos u otros microbios muertos, atenuados o inactivados. El término antígeno también se refiere a mimotopos de péptidos sintéticos que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico (epitopo). El término antígeno también se refiere a un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante antigénico in vivo, tal como en las aplicaciones de inmunización de ADN.

La "antigenicidad", como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido para unirse inmunoespecíficamente por un anticuerpo producido contra la proteína o polipéptido.

El término "*Bordetella bronchiseptica*" o "*B. bronchiseptica*" se refiere a: una bacteria viva atenuada de *Bordetella bronchiseptica*, un extracto de células enteras muertas (bacterina) de *Bordetella bronchiseptica* o un extracto bacteriano celular de *Bordetella bronchiseptica*.

El término "enfermedad bacteriana" o "infección bacteriana" se refiere a una enfermedad que es causada ya sea directamente por una bacteria particular (por ejemplo, *B. bronchiseptica*) o exacerbada como resultado del patógeno bacteriano en un estado de enfermedad multifactorial.

"Tampón" significa un sistema químico que evita el cambio en la concentración de otra sustancia química. Los sistemas de donantes y aceptores de protones sirven como tampones, evitando cambios marcados en la concentración de iones de hidrógeno (pH). Un ejemplo adicional de un tampón es una solución que contiene una mezcla de un ácido débil y su sal (base conjugada), o una base débil y su sal (ácido conjugado).

"Canino", como se usa en la presente memoria, incluye lo que comúnmente se denomina perro, pero incluye a otros miembros de la familia *Canidae*.

El término "línea celular" o "célula huésped", como se usa en la presente memoria, significa una célula procarionta o eucariota en la que un virus se puede replicar o mantener.

El término administración conjunta se refiere a la administración separada, secuencial o simultánea. Los antígenos o agentes administrados conjuntamente pueden estar en la misma composición, tal como una vacuna de combinación multivalente o composiciones separadas que comprenden diferentes formas de dosificación.

El término "cultivo", como se usa en la presente memoria, significa una población de células o microorganismos que crecen en ausencia de otras especies o tipos.

"Dosis" se refiere a una vacuna o composición inmunogénica administrada a un sujeto. Una "primera dosis" o "dosis de cebado" se refiere a la dosis de dicha composición administrada el día 0. Una "segunda dosis" o una "tercera dosis" o una "dosis anual" se refiere a una cantidad de tal composición administrada después de la primera dosis.

Un "epitopo" es el sitio específico del antígeno que se une a un receptor de células T o un anticuerpo específico, y por lo general comprende desde aproximadamente 3 residuos de aminoácidos a aproximadamente 20 residuos de aminoácidos.

"Excipiente", como se usa en la presente memoria, se refiere a un componente portador no reactivo de una vacuna o composición inmunogénica que no es un antígeno. Los excipientes preferidos son aquellos conocidos en la técnica para inyección parenteral.

"Fragmento" se refiere a una porción truncada de una proteína o gen. "Fragmento funcional" y "fragmento biológicamente activo" se refieren a un fragmento que retiene las propiedades biológicas de la proteína o gen de longitud completa.

5 "Homología" u "porcentaje de homología" se refiere al porcentaje de residuos de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos o similares con los residuos en la secuencia o secuencias de comparación después de alinear las secuencias e introducir brechas, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de homología de secuencia, y también considerando cualquier sustitución conservadora como parte de la homología de secuencia.

Los "homólogos" u "homólogos de especies" incluyen genes encontrados en dos o más especies diferentes que poseen una homología de secuencia polinucleotídica sustancial y poseen las mismas funciones o propiedades biológicas o similares.

10 Preferiblemente, las secuencias de polinucleótidos que representan homólogos de especies se hibridarán en condiciones moderadamente estrictas, como se describe en la presente memoria por ejemplo, y poseen las mismas actividades o propiedades biológicas. En otro aspecto, los polinucleótidos que representan homólogos de especies compartirán más de aproximadamente 60% de homología de secuencia, más de aproximadamente 70% de homología de secuencia, más de aproximadamente 80% de homología de secuencia, más de aproximadamente 90% de homología de secuencia, más de aproximadamente 95% de homología de secuencia, 15 más de aproximadamente 96% de homología de secuencia, más de aproximadamente 97% de homología de secuencia, más de aproximadamente 98% de homología de secuencia, o más de aproximadamente 99% de homología de secuencia.

20 "Identidad" o "porcentaje de identidad" se refiere al porcentaje de nucleótidos o aminoácidos en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos en la secuencia del comparador después de alinear ambas secuencias e introducir brechas, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia.

25 La "respuesta inmune", como se usa en la presente memoria, en un sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmune humoral, una respuesta inmune celular, o una respuesta inmune humoral y celular a un antígeno. Una "respuesta inmune humoral" se refiere a una que está mediada al menos en parte por anticuerpos. Una "respuesta inmune celular" es una mediada por linfocitos T u otros glóbulos blancos o ambos, e incluye la producción de citoquinas, quimioquinas y moléculas similares producidas por los linfocitos T activados, los glóbulos blancos o ambos. Las respuestas inmunitarias se pueden determinar usando inmunoensayos estándar y ensayos de neutralización, que son conocidos en la técnica.

30 La "inmunogenicidad", como se usa en la presente memoria, se refiere a la capacidad de una proteína o polipéptido para provocar una respuesta inmune dirigida específicamente contra una bacteria o virus que causa la enfermedad identificada.

35 Una "composición inmunogénica" es una preparación que contiene un inmunógeno, que incluye, por ejemplo, una proteína, un péptido, una célula completa, un virus inactivado, subunitario o atenuado, o un polisacárido, o una combinación de los mismos, administrado para estimular el humoral del receptor y sistemas inmunes celulares a uno o más de los antígenos presentes en la composición inmunogénica. La "inmunización" es el procedimiento de administrar una composición inmunogénica y estimular una respuesta inmunitaria o inmunogénica a un antígeno en un huésped. Los huéspedes preferidos son los mamíferos, tales como los perros. Preferiblemente, la composición inmunogénica es una vacuna.

40 La "cantidad inmunológicamente protectora", como se usa en la presente memoria, es una cantidad de un antígeno eficaz para inducir una respuesta inmunogénica en el receptor que es apropiada para prevenir o mejorar los signos o síntomas de la enfermedad, incluidos los efectos adversos para la salud o las complicaciones de la misma. Se puede inducir ya sea inmunidad humoral o inmunidad celular o ambas. La respuesta inmunogénica de un animal a una composición puede evaluarse, por ejemplo, indirectamente a través de la medición de títulos de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través de la monitorización de signos y síntomas después del desafío con cepa de tipo salvaje. La inmunidad protectora conferida por una composición o vacuna se puede evaluar midiendo, por ejemplo, la reducción del desprendimiento de organismos de desafío, la reducción de signos clínicos tales como mortalidad, morbilidad, temperatura y estado físico general, salud y rendimiento del sujeto, reducción de patología macroscópica e histopatológica en tejidos vitales. La respuesta inmune puede comprender, sin limitación, la inducción de 45 inmunidad celular y/o humoral. La cantidad de una composición o vacuna que es terapéuticamente eficaz puede variar, dependiendo del organismo particular usado, o la condición del animal que está siendo tratado o vacunado, y puede ser determinada por un veterinario.

55 La administración "intranasal", como se usa en la presente memoria, se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna u otra composición, en el cuerpo de un sujeto a través o por la nariz, e implica el transporte de la sustancia principalmente a través de la mucosa nasal

El término "aislado" se refiere a una sustancia que está en forma sustancialmente pura, por ejemplo, más de aproximadamente 95% de pureza; o purificada o enriquecida de alguna manera de su entorno natural. El término

"aislado" abarca inmunógenos que están en solución con otros agentes/diluyentes/excipientes/adyuvantes/proteínas.

El "agente medicinal" se refiere a cualquier agente que sea útil en la prevención, cura o mejora de una afección médica, o la prevención de alguna afección o aparición fisiológica.

5 El "anticuerpo monoclonal", como se usa en la presente memoria, se refiere a anticuerpos producidos por una única línea de células de hibridoma, todas dirigidas hacia un epítipo en un antígeno particular. El antígeno usado para fabricar el anticuerpo monoclonal se puede proporcionar como una proteína aislada del patógeno o del patógeno completo. Un "hibridoma" es una línea celular clonal que consiste en células híbridas formadas por la fusión de una célula de mieloma y una célula específica productora de anticuerpos. En general, los anticuerpos monoclonales son de origen de ratón. Sin embargo, el anticuerpo monoclonal también se refiere a una población clonal de un anticuerpo hecho contra un epítipo particular de un antígeno producido por la tecnología de expresión en fago, o un procedimiento que es equivalente a la expresión en fago, o células híbridas de origen no ratón.

15 La administración "oral" o "peroral", como se usa en la presente memoria, se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna u otra composición, en el cuerpo de un sujeto a través de boca o por la boca e implica la deglución o el transporte a través de la mucosa oral (por ejemplo, absorción sublingual o bucal) o ambas. Intratraqueal es también un medio de administración oral o peroral.

20 La administración por vía "oronasal", como se usa en la presente memoria, se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una composición o vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o por medio de la nariz y la boca, como ocurriría, por ejemplo, por colocando una o más gotas en la nariz. La administración oronasal implica procedimientos de transporte asociados con la administración oral e intranasal.

25 La "administración parenteral", como se usa en la presente memoria, se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una composición o vacuna, en el cuerpo de un sujeto a través o por medio de una ruta que no incluye el tracto digestivo. La administración parenteral incluye la administración subcutánea, intramuscular, intraarterial e intravenosa. Para los fines de esta divulgación, la administración parenteral excluye las rutas de administración que implican principalmente el transporte de la sustancia a través del tejido mucoso en la boca, nariz, tráquea y pulmones.

30 El término "patógeno" o "microorganismo patógeno", como se usa en la presente memoria, significa un microorganismo, por ejemplo CPIV, CAV-2, CRCoV, *Mycoplasma cynos*, CIV o *Bordetella bronchiseptica*, que es capaz de inducir o causar una enfermedad, afección o estado anormal en su animal huésped, preferiblemente una enfermedad respiratoria, tal como CIRDC.

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a sustancias que, dentro del alcance del buen juicio médico, son apropiados para su uso en contacto con los tejidos de sujetos sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares indebidas, proporcionales a una proporción razonable beneficio-riesgo y eficaz para su uso previsto.

35 El "anticuerpo policlonal", como se usa en la presente memoria, se refiere a una población mixta de anticuerpos producidos contra un patógeno o antígeno particular. En general, la población contiene una variedad de grupos de anticuerpos, cada grupo dirigido hacia un epítipo particular del patógeno o antígeno. Para producir anticuerpos policlonales, todo el patógeno, o un antígeno aislado, se introduce por inoculación o infección en un huésped, lo que induce al huésped a producir anticuerpos contra el patógeno o antígeno.

40 El término "polinucleótido", como se usa en la presente memoria, significa una molécula de polímero orgánico compuesta de monómeros de nucleótidos unidos covalentemente en una cadena. El ADN (ácido desoxirribonucleico) y el ARN (ácido ribonucleico) son ejemplos de polinucleótidos con distintas funciones biológicas.

45 El término "polipéptido", como se usa en la presente memoria, significa una molécula polimérica orgánica compuesta de dos o más aminoácidos unidos en una cadena.

50 La administración "respiratoria", como se usa en la presente memoria, se refiere a la introducción de una sustancia, tal como una vacuna u otra composición, en el cuerpo de un sujeto a través o por medio de inhalación de una sustancia nebulizada (atomizada). En la administración respiratoria, el mecanismo de transporte primario implica la absorción de la sustancia atomizada a través de la mucosa en la tráquea, los bronquios y los pulmones y, por lo tanto, es diferente de la administración intranasal o peroral.

55 Los términos "unión específica", "se une específicamente" y similares, se definen como dos o más moléculas que forman un complejo que se puede medir en condiciones fisiológicas o de ensayo y es selectivo. Se dice que un anticuerpo u otro inhibidor "se une específicamente" a una proteína si, en condiciones apropiadamente seleccionadas, tal unión no se inhibe sustancialmente, mientras que al mismo tiempo se inhibe la unión no específica. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y es selectiva para el compuesto o proteína. La unión no específica generalmente tiene baja afinidad. La unión en anticuerpos IgG, por ejemplo, generalmente

- se caracteriza por una afinidad de al menos aproximadamente  $10^{-7}$  M o más, al menos aproximadamente  $10^{-8}$  M o más, o al menos aproximadamente  $10^{-9}$  M o más, o al menos aproximadamente  $10^{-10}$  o más, o al menos aproximadamente  $10^{-11}$  M o más, o al menos aproximadamente  $10^{-12}$  M o más. El término también es aplicable cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que no es transportado por numerosos antígenos, en cuyo caso el anticuerpo que lleva el dominio de unión a antígeno generalmente no se unirá a otros antígenos.
- 5 El "fragmento inmunogénico específico", como se usa en la presente memoria, se refiere a una porción de una secuencia que es reconocible por un anticuerpo o célula T específica para esa secuencia.
- 10 "Sujeto", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier animal que tenga un sistema inmune, que incluye mamíferos, tales como perros.
- "Sustancialmente idéntico", como se usa en la presente memoria, se refiere a un grado de identidad de secuencia de al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99%.
- 15 La "vacuna de subunidad" y la "composición de subunidad", como se usa en la presente memoria, se refiere a un tipo de vacuna o composición que incluye antígenos, pero no todos los antígenos, que se derivan o son homólogos de antígenos de un patógeno de interés, tal como un virus, bacteria, parásito u hongo. Dicha composición o vacuna está libre de células patógenas intactas o partículas patógenas, o el lisado de tales células o partículas. De este modo, una vacuna de subunidad o composición de subunidad se puede preparar a partir de polipéptidos inmunogénicos al menos parcialmente purificados o sustancialmente purificados del patógeno o sus análogos. Los procedimientos de obtención de un antígeno o antígenos en la vacuna de subunidades o composición de subunidades incluyen técnicas de purificación estándar, producción recombinante o síntesis química. De este modo, una "vacuna de subunidad" o "composición de subunidad" se refiere a una vacuna o composición que consiste en un componente o componentes antigénicos definidos de un virus, bacteria u otro inmunógeno.
- 20 "TCID<sub>50</sub>" se refiere a "dosis infecciosa de cultivo de tejidos" y se define como la dilución de un virus requerida para infectar el 50% de un lote dado de cultivos celulares inoculados. Se pueden usar diversos procedimientos para calcular TCID<sub>50</sub>, incluido el procedimiento Spearman-Kärber, que se usa a lo largo de esta especificación. Para una descripción del procedimiento Spearman-Kärber, véase B. W. Mahy & H. O. Kangro, *Virology Methods Manual* 25-46 (1996).
- 25 El "agente terapéutico", como se usa en la presente memoria, se refiere a cualquier molécula, compuesto, virus o tratamiento, preferiblemente un virus atenuado o eliminado, o subunidad o compuesto, que ayuda en el tratamiento de una infección viral, bacteriana, parasitaria o fúngica, enfermedad o afección causada por el mismo.
- 30 "Cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad de un antígeno o vacuna o composición que induciría una respuesta inmune en un sujeto (por ejemplo, perro) que recibe el antígeno o vacuna o composición que es apropiada para prevenir o mejorar los signos o síntomas de la enfermedad, incluidos los efectos adversos para la salud o las complicaciones de los mismos, causados por la infección con un patógeno, tal como un virus, bacteria, parásito u hongo. Se puede inducir inmunidad humoral o inmunidad mediada por células, o tanto inmunidad humoral como mediada por células. La respuesta inmunogénica de un animal a un antígeno, vacuna o composición se puede evaluar indirectamente a través de la medición de títulos de anticuerpos, ensayos de proliferación de linfocitos, o directamente a través de la monitorización de signos y síntomas después del desafío con la cepa de tipo salvaje. La inmunidad protectora conferida por una vacuna o composición se puede evaluar midiendo la reducción del desprendimiento del organismo de desafío y/o la reducción de los signos clínicos, tal como la mortalidad, la morbilidad, la temperatura y el estado físico general, la salud y el rendimiento del sujeto. La cantidad de una vacuna o composición que es terapéuticamente eficaz puede variar, dependiendo del inmunógeno particular usado, o la condición del sujeto, y puede ser determinada por un experto en el arte.
- 35 "Que trata" o "tratamiento" de una enfermedad en un paciente se refiere a: inhibir la enfermedad o detener su desarrollo; proteger contra la enfermedad o prevenir que la enfermedad ocurra en un paciente que está predispuesto o que aún no muestra síntomas de la enfermedad; o mejorar o causar la regresión de la enfermedad. Del mismo modo, los términos "proteger", "que protege", "protección" y similares significan la reducción o eliminación de los signos clínicos de la enfermedad. También puede significar la reducción o eliminación del o los agentes causantes de la enfermedad.
- 40 "Vacuna" o "composición de vacuna", como se usa en la presente memoria, se refiere a una composición inmunogénica seleccionada de un virus o bacteria, ya sea viva modificada, atenuada o muerta, o una vacuna de subunidad, o cualquier combinación de las mencionadas anteriormente. La administración de la vacuna a un sujeto produce una respuesta inmune. La vacuna se puede introducir directamente en el sujeto por cualquier vía de administración conocida, que incluye parenteralmente, peroralmente y similares. Los términos significan una
- 45
- 50
- 55

composición que previene o reduce una infección, o que previene o reduce uno o más signos o síntomas de infección. Los efectos protectores de una composición de vacuna contra un patógeno normalmente se logran induciendo en el sujeto una respuesta inmune. En términos generales, la incidencia de infección abolida o reducida, la mejora de los signos o síntomas o la eliminación acelerada del microorganismo de los sujetos infectados son indicativos de los efectos protectores de una composición de vacuna. Las composiciones de vacuna de la presente invención proporcionan efectos protectores contra infecciones causadas por patógenos de enfermedades respiratorias caninas.

"Veterinariamente aceptable", como se usa en la presente memoria, se refiere a sustancias que, dentro del alcance del buen juicio médico, son apropiados para su uso en contacto con los tejidos de sujetos veterinarios sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares indebidos, proporcional a una relación beneficio-riesgo razonable y eficaz para su uso previsto.

"Portador veterinariamente aceptable", como se usa en la presente memoria, se refiere a un medio portador que no interfiere con la efectividad de la actividad biológica del ingrediente activo, y no es tóxico para el sujeto veterinario al que se administra.

#### 15 Antígenos, composiciones inmunogénicas y vacunas.

La presente invención proporciona composiciones y vacunas que comprenden uno o más virus, en particular CRCoV y opcionalmente bacterias o subunidades que son apropiados para la administración a un canino para la prevención contra una enfermedad, tal como CIRDC. El coronavirus respiratorio canino (CRCoV) usado en esta invención se puede caracterizar como un coronavirus presente en las vías respiratorias de perros con enfermedades respiratorias infecciosas. CRCoV está filogenéticamente más estrechamente relacionado con el coronavirus bovino (BCoV), la cepa OC43 del coronavirus humano (HCoV) y el virus de la encefalomiелitis hemaglutinante (HEV); el coronavirus canino entérico (CCoV) solo está relacionado distantemente con CRCoV.

Preferiblemente, el CRCoV es el mismo que el descrito en el documento US 2007-0098739, con respecto a las cepas y antígenos de CRCoV descritos en el mismo. Fragmentos inmunogénicos apropiados de CRCoV se describen en WO 2004/011651 (The Royal Veterinary College). Los fragmentos inmunogénicos apropiados de CRCoV incluyen las proteínas de superficie Spike (S) y la hemaglutinina (HE), la glicoproteína de membrana (M) y la proteína nucleocápside (N), o porciones inmunogénicas de las mismas. Las proteínas Spike y HE tipo CRCoV descritas en el documento WO 2004/011651 también pueden ser apropiados como agentes que aumentan la respuesta inmune contra CRCV. Los coronavirus estrechamente relacionados, tales como el coronavirus bovino y el coronavirus humano, y fragmentos inmunogénicos de los mismos, también pueden ser apropiados como agentes que aumentan la respuesta inmune contra el CRCV. La divulgación completa del documento WO 2004/011651 se refiere a agentes que se pueden usar como un componente de vacuna contra CRCV. Otro ejemplo de un CRCoV apropiado para su uso en la presente invención incluye una cepa identificada como cepa 4182 de CRCoV (Erles et al., Virus Res., 124:78-87, 2007).

Los antígenos del virus de la gripe usados en esta invención pueden ser cualquier cepa del virus de la gripe identificada, de cualquier ave o mamífero, incluyendo, pero no limitando a, el virus de la gripe que tiene el subtipo H3 hemaglutinina y el subtipo N8 neuraminidasa, o el subtipo H3N8, más comúnmente denominado como un virus H3N8. La gripe puede ser de origen mamífero o aviar, incluyendo, pero no limitando a, origen porcino, equino o canino. En una realización, se usa un antígeno de gripe canina. En una realización, se usa un antígeno de gripe equina. En una realización, se usa una cepa que tiene las glicoproteínas de subtipo designadas H3 o N8. En una realización, se usa una cepa que tiene glicoproteínas de los subtipos H3 y N8.

Los antígenos de la gripe se pueden aislar de perros, caballos, cerdos y aves, tanto domésticos como salvajes. Los animales elegidos para la recolección de muestras deben mostrar síndromes clínicos agudos y/o subagudos, que pueden incluir síntomas respiratorios leves a severos y fiebre. Los animales también pueden mostrar signos de anorexia y letargo. Los expertos en el arte conocen bien los procedimientos de aislamiento de virus, que incluyen: inocular cultivos de células de mamíferos o aves, inocular huevos embrionados con muestras de moco nasal o faríngeo de muestras clínicas, recolectar mediante frotis del conducto nasal o la garganta, o mediante la recolección de tejidos tales como lavado de bazo, pulmón, amígdalas e hígado y pulmón. El efecto citopático del virus se puede observar en cultivo celular. El líquido alantoideo o los lisados celulares se pueden analizar para determinar su capacidad de aglutinar glóbulos rojos humanos, de pollo, de pavo o de cobaya, evidencia presunta de la presencia de un virus de la gripe.

Un ejemplo representativo de una cepa del virus de la gripe canina (CIV) apropiada para su uso en la presente invención incluye una cepa identificada como A/canine/Iowa/9A1/B5/08/D12, que se depositó como PTA-7694 el 29 Junio de 2006 en the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209. Una cepa representativa del antígeno CIV es la cepa del virus CIV en la vacuna comercial, Vanguard® CIV (Pfizer). Esta invención también abarca vacunas que comprenden una cepa identificada como cepa de gripe equina A/Equine/2/Miami/1/63. Esta cepa se deposita en el ATCC, con el número de acceso VR 317. Ejemplos adicionales de virus de gripe para su uso en la presente invención son A/canine/Iowa/13628/2005, A/Equine/Kentucky/1998, A/Equine/Kentucky/15/2002, A/Equine/Ohio/1/2003, A/Equine/Kentucky/1/1994,

A/Equine/Massachusetts/213/2003, A/Equine/Wisconsin/2003, A/Equine/NewYork/1999, y A/Equine/Newmarket/A2/1993. Otras cepas y/o aislamientos preferidos de CIV incluyen los divulgados en las Patentes de los Estados Unidos Nos. 7,959,929 (en particular cepas y secuencias de HA identificadas en el mismo como Jacksonville/ 2005, Miami/2005, FL/242/03 and Florida/43/04), 7,384,642, 7,572,620 and 7,468,187. Además, una cepa CIV apropiada para su uso en la presente memoria incluye el aislado de CIV de Colorado descrito en Barrell et al., J. Vet. Intern. Med., 24 (6), 1524-1527 (2010), con número de acceso ADW41784.

El virus de parainfluenza canina (CPIV) usado en esta invención se puede caracterizar como uno de los virus que se sabe que es un agente causal asociado con la tos de las perreras. Una cepa representativa del antígeno CPIV es la cepa atenuada del virus CPI en la vacuna comercial, Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Otra cepa representativa del antígeno CPIV es la cepa de virus CPI atenuada que tiene la designación de "NL-CPI-5" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

El adenovirus canino, tipo 2 (CAV-2) usado en esta invención se puede caracterizar como uno de los virus que también se sabe que es un agente causal asociado con la tos de las perreras. Una cepa representativa del antígeno CAV-2 es la cepa atenuada del virus CAV-2 en la vacuna comercial, Vanguard® Plus 5 (Pfizer). Una cepa representativa del antígeno CAV-2 es la cepa atenuada CAV-2 designada como la cepa "Manhattan" (National Veterinary Service Laboratory, Ames, IA).

El *Mycoplasma cynos* (*M. cynos*) usado en esta invención se divulga en Chalker et al., Microbiology, 150:3491-3497, 2004 y es la única especie de micoplasma comúnmente asociada con enfermedades respiratorias. Las composiciones inmunogénicas contra *M. cynos* se describen en el documento US 2007/0098739, incorporado en la presente memoria como referencia.

El componente de *Bordetella bronchiseptica* usado por esta invención se puede caracterizar como el agente causante bacteriano asociado con la tos de la perrera. Las composiciones inmunogénicas y las vacunas abarcadas por la presente invención pueden ser una o más de: una *Bordetella bronchiseptica* viva atenuada, una bacterina de *Bordetella bronchiseptica* o un extracto bacteriano. Además, la composición también incluye preferiblemente un antígeno de subunidad aislado de *Bordetella bronchiseptica*.

En una alternativa, la *Bordetella bronchiseptica* se prepara como un sonicato de células enteras purificado mediante cromatografía en columna como se proporciona en la Solicitud de Patente No. FR2571618, presentada el 12 de octubre de 1984. Otro ejemplo representativo de una *Bordetella bronchiseptica* es el extracto bacteriano Bronchicine™ CAe (Pfizer), que se prepara a partir de material antigénico extraído de células de *Bordetella bronchiseptica*. Otro ejemplo de *Bordetella bronchiseptica* es la cepa *bronchiseptica* viva atenuada B-C2 presente en Nobivac® y/o la cepa *bronchiseptica* viva de Intra-Trac®, Bronchi-Shield®, Naramune™, Recombitek®, Univac, y/o Kennel-Jec™.

Además, también se puede presentar una subunidad (esto es, suplementada), en combinación con el componente de *Bordetella bronchiseptica*. Un ejemplo representativo de la subunidad es un antígeno de pertactina aislado, preferiblemente, un antígeno de *Bordetella bronchiseptica* p68, en particular el antígeno recombinante de *Bordetella bronchiseptica* p68 que es reconocido por el anticuerpo monoclonal específico p68 Bord 2-7 (descrito en el documento US 7,736,658) y en una realización preferida, tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en el documento US 7,736,658 o que tiene homología con la misma.

Los virus usados por la presente invención se pueden propagar en células, líneas celulares y células huésped. Dichas células, líneas celulares o células huésped pueden ser, por ejemplo, pero sin limitación, células de mamífero y células no de mamífero, incluidas células de insectos y plantas. Las células, líneas celulares y células huésped en las que se pueden propagar los virus usados por la presente invención son fácilmente conocidas y accesibles para los expertos en el arte.

Las bacterias usadas por la presente invención se pueden cultivar y propagar usando diversos medios de cultivo conocidos para los expertos en el arte, que incluyen medios de cultivo de caldo (líquido) y agar (sólido; semisólido). Algunas bacterias también se pueden cultivar y propagar en células de mamíferos o células no mamíferas.

Los virus y bacterias usados por la presente invención se pueden atenuar o inactivar antes de su uso en una composición inmunogénica o vacuna. Los procedimientos de atenuación e inactivación son bien conocidos para los expertos en el arte. Los procedimientos para la atenuación incluyen, pero no se limitan a, pasaje en serie en cultivo celular en una línea celular apropiada (virus y algunas bacterias), pasaje en serie en cultivo de caldo (bacterias), irradiación ultravioleta (virus y bacterias) y mutagénesis química (virus y bacterias). Los procedimientos para la inactivación viral o bacteriana incluyen, pero no se limitan a, tratamiento con formalina, betapropiolactona (BPL) o etilenimina binaria (BEI) u otros procedimientos conocidos para los expertos en el arte.

La inactivación por formalina se puede realizar mezclando la suspensión que contiene el microorganismo con formaldehído al 37% hasta una concentración final de formaldehído del 0,5%. La mezcla microorganismo-

formaldehído se mezcla mediante agitación constante durante aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente. La mezcla de microorganismos inactivados luego se analiza para detectar organismos vivos residuales mediante el análisis de crecimiento en una línea celular apropiada o medio de caldo.

5 Para algunos antígenos, la inactivación por BEI se puede realizar mezclando la suspensión que contiene el microorganismo de la presente invención con BEI 0,1 M (2-bromo-etilamina en NaOH 0,175 N) a una concentración final de BEI de 1 mM. Para otros antígenos, la concentración final de BEI es de 2 mM. Un experto en el arte conocerá la concentración apropiada para usar. La mezcla de virus-BEI se mezcla mediante agitación constante durante aproximadamente 48 horas a temperatura ambiente, seguido de la adición de tiosulfato de sodio 1,0 M a una concentración final de 0,1 mM. La mezcla continúa durante dos horas adicionales. La mezcla  
10 que contiene el microorganismo inactivado se analiza para detectar virus vivos residuales analizando el crecimiento en una línea celular o medio de caldo apropiado.

15 Las composiciones inmunogénicas y las vacunas abarcadas por la presente invención pueden incluir uno o más portadores veterinarios aceptables. Como se usa en la presente memoria, un "portador veterinariamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, adyuvantes, agentes estabilizantes, diluyentes, conservantes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos, agentes de retardo de adsorción y similares. Los diluyentes pueden incluir agua, solución salina, dextrosa, etanol, glicerol y similares. Los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa, entre otros conocidos para los expertos en el arte. Los estabilizantes incluyen albúmina, entre otros conocidos para el experto en el arte. Los conservantes incluyen merthiolate, entre otros conocidos para el experto en el arte.

20 El adyuvante puede ser metabolizable, en referencia a adyuvantes que consisten en componentes que pueden ser metabolizados por las especies diana, tales como adyuvantes basados en aceite vegetal. Un adyuvante metabolizable puede ser un aceite metabolizable. Los aceites metabolizables son grasas y aceites que por lo general se encuentran en plantas y animales, y generalmente consisten en mezclas de triacilgliceroles, también conocidos como triglicéridos o grasas neutras. Estas sustancias no polares insolubles en agua son triésteres de  
25 ácidos grasos de glicerol. Los triacilgliceroles difieren según la identidad y la ubicación de sus tres residuos de ácidos grasos o cadenas laterales.

El adyuvante también puede ser no metabolizable, refiriéndose a adyuvantes que consisten en componentes que no pueden ser metabolizados por el cuerpo del sujeto animal al que se administra la emulsión. Los aceites no metabolizables apropiados para su uso en composiciones de la presente invención incluyen alcanos, alquenos, alquinos y sus correspondientes ácidos y alcoholes, los éteres y ésteres de los mismos, y las mezclas de los mismos. Preferiblemente, los compuestos individuales del aceite son compuestos de hidrocarburos ligeros, esto es, tales componentes tienen de 6 a 30 átomos de carbono. El aceite se puede preparar sintéticamente o purificarse a partir de productos derivados del petróleo. Los aceites no metabolizables preferidos para su uso en las composiciones descritas en la presente memoria incluyen aceite mineral, aceite de parafina y cicloparafinas, por ejemplo. El término "aceite mineral" se refiere a un aceite adyuvante no metabolizable que es una mezcla de hidrocarburos líquidos obtenidos de vaselina mediante una técnica de destilación. El término es sinónimo de "parafina licuada", "vaselina líquida" y "aceite mineral blanco". El término también pretende incluir "aceite mineral ligero", esto es, aceite que se obtiene de manera similar por destilación de vaselina, pero que tiene una gravedad específica ligeramente menor que el aceite mineral blanco. El aceite mineral se puede obtener de diversas fuentes comerciales, por ejemplo, J.T. Baker (Phillipsburg, PA), USB Corporation (Cleveland, OH). El aceite mineral ligero está disponible comercialmente con el nombre DRAKEOL®.

Los adyuvantes incluyen, pero no se limitan a, el sistema adyuvante Emulsigen (MVP Laboratories; Ralston, NE), el sistema adyuvante RIBI (Ribi Inc.; Hamilton, MT), alumbre, gel de hidróxido de aluminio, emulsiones de aceite en agua, emulsiones de agua en aceite tales como, por ejemplo, adyuvantes completos e incompletos de Freund, copolímero de bloque (CytRx; Atlanta, GA), SAF-M (Chiron; Emeryville, CA), adyuvante AMPHIGEN®, saponina, Quil A, QS- 21 (Cambridge Biotech Inc.; Cambridge, MA), GPI-0100 (Galénica Pharmaceuticals, Inc.; Birmingham, AL) u otras fracciones de saponina, monofosforil lípido A, adyuvante de lipidamina de avridina, enterotoxina termolábil de *E. coli* (recombinante o de otra manera), toxina del cólera, dipéptido de muramil, copolímero en bloque de escualeno/plurónico /tensioactivo (aceite SP), sulfolipobeta-ciclodextrina (SL-CD), liposomas que contienen un inmunomodulador (por ejemplo, CpG o poli I:C), dipéptido de muramilo (MDP), iscomatriz (Quil A/fosfotidilcolina), CpG/DEAE dextrano/aceite mineral (TXO), CpG, triterpenoides (por ejemplo, Quil A u otra preparación de saponina purificada o parcialmente purificada), esteroides (por ejemplo, colesterol), agentes inmunomoduladores (por ejemplo, bromuro de dimetil dioctadecil amonio - DDA), polímeros (por ejemplo, ácido poliacrílico tal como CARBOPOL®) y estimulantes Th2 (por ejemplo, glucolípidos tal como Bay R1005®), y combinaciones de los mismos, entre muchos otros adyuvantes conocidos para los expertos en el arte.

Los ejemplos no limitantes de diversas combinaciones que se pueden usar incluyen un triterpenoide más un esteroide (por ejemplo, Quil A/colesterol, también conocido como QAC), un triterpenoide más un esteroide, un agente inmunomodulador y un polímero (por ejemplo, Quil A/colesterol/DDA/CARBOPOL®, también conocido como

QCDC), y un triterpenoide más un esteroide, un agente inmunomodulador, un polímero y un estimulante Th2 (por ejemplo, Quil A/colesterol/DDA/CARBOPOL® y Bay R1005®, también conocido como QCDCR).

5 Las cantidades y concentraciones de adyuvantes y aditivos útiles en el contexto de la presente invención pueden ser determinadas fácilmente por el experto en el arte. En una realización, la presente invención contempla composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden desde aproximadamente 20 µg a aproximadamente 2000 µg de adyuvante. En otra realización, el adyuvante se incluye en una cantidad desde aproximadamente 100 µg a aproximadamente 1500 µg, o desde aproximadamente 250 µg a aproximadamente 1000 µg, o desde aproximadamente 350 µg a aproximadamente 750 µg. En otra realización, el adyuvante se incluye en una cantidad de aproximadamente 500 µg/2 ml de dosis de la composición inmunogénica o vacuna.

10 Las composiciones inmunogénicas y las vacunas también pueden incluir antibióticos. Tales antibióticos incluyen, pero no se limitan a, los de las clases de aminoglucósidos, carbapenémicos, cefalosporinas, glucopéptidos, macrólidos, penicilinas, polipéptidos, quinolonas, sulfonamidas y tetraciclinas. En una realización, la presente invención contempla composiciones inmunogénicas y vacunas que comprenden desde aproximadamente 1 µg/ml a aproximadamente 60 µg/ml de antibiótico. En otra realización, las composiciones inmunogénicas y las vacunas comprenden desde aproximadamente 5 µg/ml a aproximadamente 55 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 50 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 15 µg/ml a aproximadamente 45 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 20 µg/ml a aproximadamente 40 µg/ml de antibiótico, o desde aproximadamente 25 µg/ml a aproximadamente 35 µg/ml de antibiótico. En otra realización más, las composiciones inmunogénicas y las vacunas comprenden menos de aproximadamente 30 µg/ml de antibiótico.

15 Las composiciones inmunogénicas y las vacunas abarcadas por la presente invención pueden incluir una o más moléculas polinucleotídicas que codifican un virus o bacteria, o una proteína viral o bacteriana. Las moléculas de ADN o ARN se pueden usar en composiciones inmunogénicas o vacunas. La molécula de ADN o ARN se puede administrar en ausencia de otros agentes, o se puede administrar junto con un agente que facilite la absorción celular (por ejemplo, liposomas o lípidos catiónicos). El polinucleótido total en la composición inmunogénica o vacuna estará generalmente entre aproximadamente 0,1 µg/ml y aproximadamente 5,0 mg/ml. En otra realización, el polinucleótido total en la composición inmunogénica o vacuna será desde aproximadamente 1 µg/ml y aproximadamente 4,0 mg/ml, o desde aproximadamente 10 µg/ml y aproximadamente 3,0 mg/ml, o desde aproximadamente 100 µg/ml y aproximadamente 2,0 mg/ml. Las vacunas y los procedimientos de vacunación que usan ácidos nucleicos (ADN o ARNm) se han descrito bien en la técnica, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos No. 5,703,055, la Patente de los Estados Unidos No. 5,580,859, la Patente de los Estados Unidos No. 5,589,466.

20 Además de los virus o bacterias descritos anteriormente, las composiciones inmunogénicas y las vacunas abarcadas por la presente invención pueden incluir otros antígenos adicionales. Los antígenos pueden estar en forma de una preparación parcial o total inactivada del microorganismo, o en forma de moléculas antigénicas obtenidas por técnicas de ingeniería genética o síntesis química. Otros antígenos apropiados para su uso de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los derivados de virus patógenos tales como el virus del moquillo canino, el virus del herpes canino, el virus de la gripe canina, el virus de la rabia, las bacterias patógenas tal como *Leptospira bratislava*, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, *Leptospira hardjovovis*, *Porphyromonas* spp., *Bacteriodes* spp., *Borrelia* spp., *Streptococcus* spp., incluyendo *Streptococcus equi* subespecies *zooepidemicus*, *Ehrlichia* spp., *Mycoplasma* spp., incluyendo *Mycoplasma cynos*, y *Microsporium canis*. Los antígenos también se pueden derivar de hongos patógenos tales como *Candida*, protozoos tal como *Cryptosporidium parvum*, *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii*, *Eimeria* spp., *Babesia* spp., *Giardia* spp., *Leishmania* spp., o helmintos tales como *Taenia*, *Cuterebra*, *Echinococcus*, y *Paragonimus* spp.

#### Formas, dosis, vías de administración

25 Las composiciones inmunogénicas y las vacunas abarcadas por la presente invención se pueden administrar a animales para inducir una respuesta inmune eficaz contra estados de enfermedad multipatógenos asociados con *B. bronchiseptica*. De acuerdo con lo anterior, la presente divulgación proporciona procedimientos para estimular una respuesta inmune eficaz administrando a un animal una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunogénica o vacuna descrita en la presente memoria.

30 Las composiciones inmunogénicas y las vacunas descritas en la presente memoria se pueden administrar a un animal para vacunar al sujeto animal contra CIRDC. Las composiciones inmunogénicas y las vacunas se pueden administrar al animal para prevenir o tratar el CIRDC en el animal. De acuerdo con lo anterior, se describen en la presente memoria procedimientos para vacunar a un animal contra CIRDC, y prevenir o tratar CIRDC, que comprende administrar al animal una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición inmunogénica o vacuna descrita en la presente memoria.

- 5 Las composiciones inmunogénicas y las vacunas se pueden preparar en diversas formas dependiendo de la vía de administración. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas y las vacunas se pueden preparar en forma de soluciones o dispersiones acuosas estériles apropiados para uso inyectable, o fabricadas en formas liofilizadas usando técnicas de liofilización. Las composiciones inmunogénicas liofilizadas y las vacunas se mantienen por lo general a aproximadamente 4 °C, y se pueden reconstituir en una solución estabilizante, por ejemplo, solución salina o HEPES, con o sin adyuvante. Las composiciones inmunogénicas y las vacunas también se pueden preparar en forma de suspensiones o emulsiones.
- 10 Las composiciones inmunogénicas y las vacunas de la presente invención incluyen una cantidad terapéuticamente eficaz de uno o más de los microorganismos descritos anteriormente. Los virus y/o bacterias purificados se pueden usar directamente en una composición inmunogénica o vacuna, o se pueden atenuar o inactivar adicionalmente. Por lo general, una composición inmunogénica o vacuna contiene entre aproximadamente  $1 \times 10^2$  y aproximadamente  $1 \times 10^{12}$  partículas virales o bacterianas, o entre aproximadamente  $1 \times 10^3$  y aproximadamente  $1 \times 10^{11}$  partículas, o entre aproximadamente  $1 \times 10^4$  y aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  partículas, o entre aproximadamente  $1 \times 10^5$  y aproximadamente  $1 \times 10^9$  partículas, o entre aproximadamente  $1 \times 10^6$  y aproximadamente  $1 \times 10^8$  partículas. Un experto en el arte puede determinar la cantidad precisa de un microorganismo en una composición inmunogénica o vacuna eficaz para proporcionar un efecto protector.
- 15 Las composiciones inmunogénicas y vacunas generalmente comprenden un portador veterinariamente aceptable, en un volumen de entre aproximadamente 0,5 ml y aproximadamente 5 ml. En otra realización, el volumen del portador está entre aproximadamente 1 ml y aproximadamente 4 ml, o entre aproximadamente 2 ml y aproximadamente 3 ml. En otra realización, el volumen del portador es de aproximadamente 1 ml, o es de aproximadamente 2 ml, o es de aproximadamente 5 ml. Los portadores veterinariamente aceptables apropiados para su uso en composiciones inmunogénicas y vacunas pueden ser cualquiera de los descritos anteriormente.
- 20 Los expertos en el arte pueden determinar fácilmente si un virus o bacteria necesita ser atenuado o inactivado antes de la administración. En otra realización de la presente invención, un virus o bacteria se puede administrar directamente a un animal sin atenuación adicional. La cantidad de un microorganismo que es terapéuticamente eficaz puede variar, dependiendo del microorganismo particular usado, la condición del animal y/o el grado de infección, y puede ser determinada por un experto en el arte.
- 25 De acuerdo con los procedimientos divulgados en la presente memoria, se puede administrar una dosis única a los animales, o, alternativamente, se pueden realizar dos o más inoculaciones con intervalos desde aproximadamente dos a aproximadamente diez semanas. Se pueden requerir regímenes de refuerzo, y el régimen de dosificación se puede ajustar para proporcionar una inmunización óptima. Los expertos en el arte pueden determinar fácilmente el régimen de administración óptimo.
- 30 Las vacunas y composiciones inmunogénicas se pueden administrar directamente en el torrente sanguíneo, en el músculo, en un órgano interno o debajo de la piel. Los medios apropiados para la administración parenteral incluyen la administración intravenosa, intraarterial, intramuscular y subcutánea. Los dispositivos apropiados para la administración parenteral incluyen inyectores con aguja (incluyendo microagujas) e inyectores sin aguja.
- 35 Las formulaciones parenterales son por lo general soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos, proteínas y agentes tamponantes (preferiblemente a un pH desde aproximadamente 3 a aproximadamente 9, o desde aproximadamente 4 a aproximadamente 8, o desde aproximadamente 5 a aproximadamente 7,5, o desde aproximadamente 6 a aproximadamente 7,5, o aproximadamente 7 a aproximadamente 7,5), pero, para algunas aplicaciones, se pueden formular de manera más apropiada como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para usarse junto con un vehículo apropiado tal como agua estéril, libre de pirógenos o solución salina.
- 40 La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, por liofilización, se puede realizar fácilmente usando técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas para los expertos en el arte.
- 45 La solubilidad de los materiales usados en la preparación de soluciones parenterales se puede aumentar mediante el uso de técnicas de formulación apropiadas conocidas para el experto en el arte, tales como la incorporación de agentes potenciadores de la solubilidad, incluyendo tampones, sales, tensioactivos, liposomas, ciclodextrinas, y similares.
- 50 Las composiciones para administración parenteral se pueden formular para ser de liberación inmediata o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada. De este modo, las composiciones inmunogénicas y las vacunas se pueden formular como un sólido, semisólido o líquido tixotrópico para la administración como un depósito implantado, proporcionando liberación modificada de las composiciones inmunogénicas y vacunas.
- 55 Otros medios de composición inmunogénica o administración de la vacuna incluyen la administración mediante microagujas o inyección sin aguja (por ejemplo, Powderject™, Bioject™, etc.).

En los casos en que se usa inyección subcutánea o intramuscular, se prefiere una formulación isotónica. En general, los aditivos para la isotonicidad pueden incluir cloruro de sodio, dextrosa, manitol, sorbitol y lactosa. En casos particulares, se usan soluciones isotónicas tales como solución salina tamponada con fosfato. Las formulaciones pueden abarcar además estabilizantes tales como gelatina y albúmina. En algunas realizaciones, se agrega un agente vasoconstrictivo a la formulación. Las preparaciones farmacéuticas según la presente invención generalmente se proporcionan estériles y libres de pirógenos. Sin embargo, los expertos en el arte saben bien que las formulaciones para el portador farmacéuticamente aceptado son aquellos portadores farmacéuticos aprobados en las regulaciones promulgadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, o una agencia gubernamental equivalente en un país extranjero como Canadá o México., o cualquiera de las naciones europeas, para cualquier vacuna canina, composiciones inmunogénicas de subunidades de polipéptidos (antígeno) y vacunas, vacunas de vectores de virus recombinantes y vacunas de ADN. Por lo tanto, el portador farmacéuticamente aceptado para la producción comercial de las composiciones inmunogénicas o vacunas es un portador que ya está aprobado o será aprobado por la agencia gubernamental correspondiente en los Estados Unidos de América o en un país extranjero. Las composiciones inmunogénicas y las vacunas se pueden mezclar adicionalmente con un adyuvante que sea farmacéuticamente aceptable. En ciertas formulaciones de las composiciones inmunogénicas y vacunas, la composición inmunogénica o vacuna se combina con otras composiciones inmunogénicas y vacunas caninas para producir un producto polivalente que puede proteger al canino contra una amplia variedad de enfermedades causadas por otros patógenos caninos.

#### Detección y procedimientos de diagnóstico

El alcance y la naturaleza de las respuestas inmunes inducidas en el animal se pueden evaluar usando una variedad de técnicas. Por ejemplo, los sueros se pueden recoger de los animales inoculados y analizar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para los inmunógenos. La detección de linfocitos T citotóxicos (CTL) de respuesta en tejidos linfoides, indicativos de la inducción de una respuesta inmune celular, se puede lograr mediante ensayos tales como la proliferación de células T. Las técnicas relevantes están bien descritas en la técnica.

#### Kits

En la medida en que puede ser deseable administrar una composición inmunogénica o vacuna en combinación con composiciones o compuestos adicionales, por ejemplo, para prevenir o tratar una enfermedad o afección particular, está dentro del alcance de la presente invención que una composición inmunogénica o vacuna se puede incluir convenientemente en, o combinarse, en forma de un kit apropiado para la administración o coadministración de las composiciones.

De este modo, los kits pueden comprender una o más composiciones farmacéuticas separadas, al menos una de las cuales es una composición inmunogénica o vacuna de acuerdo con la presente invención, y un medio para retener por separado dichas composiciones, tales como un recipiente, una botella dividida, o paquete de papel de aluminio dividido. Un ejemplo de dicho kit es una jeringa y aguja, y similares. Un kit que comprende una composición de la presente invención es en particular apropiado para administrar diferentes formas de dosificación, por ejemplo, oral o parenteral, para administrar las composiciones separadas a diferentes intervalos de dosificación, o para titular las composiciones separadas entre sí. Para ayudar a uno a administrar una composición abarcada por la presente invención, el kit por lo general comprende instrucciones para la administración.

El kit puede comprender uno o más reactivos útiles para la detección de un animal infectado. El kit puede incluir reactivos para analizar una muestra en busca de microorganismos completos, polipéptidos, epítomos o secuencias de polinucleótidos. La presencia de virus, bacterias, polipéptidos o secuencias de polinucleótidos se puede determinar usando anticuerpos, PCR, hibridación y otros procedimientos de detección conocidos para los expertos en el arte.

El kit puede proporcionar reactivos para la detección de anticuerpos contra epítomos particulares. Tales reactivos son útiles para analizar una muestra para detectar la presencia de anticuerpos, y son fácilmente conocidos y están disponibles para un experto en el arte. La presencia de anticuerpos se puede determinar usando procedimientos de detección estándar conocidos para los expertos en el arte.

Los kits pueden incluir un conjunto de instrucciones impresas, o una etiqueta que indica que el kit es útil para la detección de animales infectados.

#### Anticuerpos

Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales o recombinantes. Los anticuerpos se pueden preparar contra el inmunógeno o una porción del mismo. Por ejemplo, un péptido sintético en base a la secuencia de aminoácidos del inmunógeno, o preparado recombinantemente por técnicas de clonación, o el producto génico natural y/o porciones del mismo se pueden aislar y usar como inmunógeno. Los inmunógenos se pueden usar para producir anticuerpos mediante tecnología de producción de anticuerpos estándar bien conocida para los

expertos en el arte. Los fragmentos de anticuerpos también se pueden preparar a partir de los anticuerpos mediante procedimientos conocidos para los expertos en el arte, e incluyen fragmentos Fab, F(ab')<sub>2</sub>, y Fv.

5 En la producción de anticuerpos, el cribado del anticuerpo deseado se puede lograr mediante procedimientos estándar en inmunología conocidos en la técnica. En general, los ELISA y la transferencia Western son los tipos preferidos de inmunoensayos. Ambos ensayos son bien conocidos para los expertos en el arte. Se pueden usar anticuerpos tanto policlonales como monoclonales en los ensayos. El anticuerpo se puede unir a un sustrato de soporte sólido, conjugado con una unidad estructural detectable, o se puede unir y conjugarse como es bien conocido en la técnica. La unión de anticuerpos a un sustrato de soporte sólido también es bien conocida en la técnica. Las unidades estructurales detectables contempladas para su uso en la presente memoria pueden incluir, pero no se limitan a, marcadores fluorescentes, metálicos, enzimáticos y radioactivos tales como biotina, oro, ferritina, fosfatasa alcalina, b-galactosidasa, peroxidasa, ureasa, fluoresceína, rodamina, tritio, <sup>14</sup>C y yodación.

**Ejemplos**

Ejemplo 1. Infección experimental de perros con CRCV usando tratamiento por aerosoles intranasal.

15 Se incluyeron en el estudio cincuenta perros, que se determinó que gozaban de buena salud general y que eran negativos a los anticuerpos contra el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) antes del día 0, según lo determinado por el ensayo indirecto de anticuerpos fluorescentes (IFA). Los animales también se confirmaron libres de CRCoV según lo determinado por el aislamiento del virus de torunda orofaríngea en el día 0.

**Tabla 1. Diseño del estudio**

Grupo	N	Desafío				Día de la necropsia
		Material de desafío	Procedimiento	Día	Dosis diana	
T01	5	Solución salina	Tratamiento por aerosoles	0	NA	4
T02	5	Solución salina				14
T03	10	CRCoV Max aislado			10 <sup>6.0</sup> TCID <sub>50</sub>	4
T04	10	CRCoV Max aislado				14
T05	10	CRCoV NP787 aislado				4
T06	10	CRCoV NP787 aislado				14
NA = No aplicable						

20 El aislado CRCoV designado Max se usó como material de desafío, y se obtuvo después de un solo paso en células HRT18G. El material de desafío se tituló en células HRT18G y se determinó que tenía una dosis infecciosa de 10<sup>7.1</sup> TCID<sub>50</sub>/ml. El aislado CRCoV designado CRCoV NP787 también se usó como material de desafío, y se obtuvo después de dos pases en células HRT18G. El material de desafío se tituló en células HRT18G, y se determinó que tenía una dosis infecciosa de 10<sup>6.5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml.

25 Se observaron animales una vez al día desde la llegada hasta el día -3. Los pesos corporales se determinaron el día -1. Se recogió una muestra de sangre de cada animal el día 0 antes del desafío. Las temperaturas timpánicas se determinaron el día -2, el día -1 y el día 0 antes del desafío. Se recogieron dos juegos de hisopos orofaríngeos de cada perro antes del desafío en el día 0. Se recogió un conjunto de hisopos en tubos VTM (medios de transporte viral) para el aislamiento del virus CRCoV, y el otro conjunto se recogió en medios Amies (aislamiento bacteriano). Se recogieron dos juegos de hisopos nasales de cada perro antes del desafío en el día 0, uno en tubos VTM para el aislamiento del virus CRCoV y el otro en los medios Amies para el aislamiento bacteriano. Los animales se observaron una vez al día en el día -2, día 1 y día 0 antes del desafío, para detectar signos clínicos de enfermedad respiratoria.

35 Las reservas de virus de desafío CRCoV se descongelaron, y se diluyeron apropiadamente a la dosis de desafío esperada (10<sup>6.0</sup>TCID<sub>50</sub>/perro). Cinco perros fueron desafiados al mismo tiempo, mediante tratamiento por

- aerosoles del desafío que contenía  $5 \times 10^{60} \text{TCID}_{50}$  para alcanzar la dosis de desafío de  $1 \times 10^6 \text{TCID}_{50}$  por perro. El material de desafío se mantuvo en hielo hasta la inoculación de desafío. A los perros de los grupos de tratamiento T01 y T02 se les administró solución salina por aerosol en una cámara de plexiglás durante un total de 30 minutos el día 0. Estos grupos fueron desafiados primero para evitar la contaminación cruzada. Los perros de los grupos de tratamiento T03 y T04 recibieron CRCoV Max aislado mediante tratamiento por aerosoles en una cámara de plexiglás durante un total de 30 minutos el día 0. Los perros de los grupos de tratamiento T05 y T06 recibieron CRCoV NP787 mediante tratamiento por aerosoles en una cámara de plexiglás por un total de 30 minutos en el día 0. El promedio de titulación después del desafío para CRCoV (Max) fue  $10^{5.2} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ , y el promedio de titulación después del desafío para CRCoV (NP787) fue  $10^{4.7} \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ .
- Las temperaturas timpánicas se determinaron diariamente después del desafío desde el día 0 hasta el día 14. Las observaciones clínicas se realizaron una vez al día durante aproximadamente 30 minutos desde el día 0 hasta el día 14. Se recogieron muestras nasales de cada perro en tubos VTM para el aislamiento del virus CRCoV desde el día 0 al día 10. Se recogieron hisopos orofaríngeos de cada perro en tubos VTM el día 2, día 3 y día 4. Se recogió una muestra de sangre para serología de cada animal el día 4 y el día 14.
- La necropsia se realizó en los grupos de tratamiento T01, T03 y T05 en el día 4 después del desafío, y en los grupos de tratamiento T02, T04 y T06 en el día 14 después del desafío. Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de barbiturato de sodio. En la necropsia, se extirpó asépticamente un pulmón completo y se colocó sobre un paño estéril. Para determinar la cantidad total de consolidación pulmonar, se puntuó cada lóbulo pulmonar para la consolidación por separado. Se cortó la tráquea y se evaluó la luz en busca de patología macroscópica. Todos los tejidos fueron evaluados y puntuados por un patólogo veterinario certificado.
- Después de puntuar los pulmones, se lavó el lóbulo caudal pulmonar derecho mediante un lavado de aproximadamente 30,0 ml de VTM (sin antibiótico ni antimicótico) a través del plexo bronquial. El medio VTM se aspiró lentamente de vuelta a la jeringa mientras se masajeaba suavemente el tejido pulmonar. Los líquidos lavados se dividieron en alícuotas y se analizaron para determinar la bacteriología y el aislamiento del virus CRCoV.
- Se recogieron muestras de tejido de la tráquea, la cavidad nasal (incluyendo la sección ciliada) y el lóbulo craneal derecho. Se recogieron dos conjuntos de muestras de tejido de la tráquea y la cavidad nasal. Un conjunto se probó para el aislamiento del virus CRCoV, y el otro conjunto se preparó para histopatología. Se recolectaron tres conjuntos de muestras de tejido del lóbulo craneal derecho del pulmón, el primer conjunto se probó para bacteriología, el segundo conjunto se probó para el aislamiento del virus CRCoV y el tercer conjunto se preparó para histopatología.
- Se analizaron hisopos nasales y orofaríngeos, muestras de tejido y lavados pulmonares para determinar el aislamiento del virus CRCoV usando células HRT18G. En resumen, las muestras se procesaron e inocularon en matraces que contenían monocapas de células HRT18G. Los matraces inoculados se incubaron durante dos semanas en una incubadora de  $\text{CO}_2$  humidificada a  $35\text{-}37^\circ\text{C}$ . De los matraces inoculados se tomaron muestras una y dos semanas después de la inoculación, ya que las muestras se inocularon en 4 pocillos de una placa de 96 pocillos sembrada con células HRT18G. Las placas inoculadas se incubaron en una incubadora de  $\text{CO}_2$  humidificada durante 5-7 días a  $35\text{-}37^\circ\text{C}$ . Al final del período de incubación, las monocapas celulares en las placas de 96 pocillos se fijaron con una solución basada en acetona y se lavaron con agua. La presencia de CRCoV se determinó mediante tinción de anticuerpos fluorescentes usando un anticuerpo conjugado con FITC específico de CRCoV, y se observó bajo un microscopio de epifluorescencia.
- Las muestras de suero fueron analizadas para anticuerpos CRCoV por IFA. En resumen, las células HRT18G se sembraron en placas de 96 pocillos y se infectaron con CRCoV con una dilución de virus para lograr 50-200 células infectadas por pocillo. Las placas infectadas se fijaron con una solución a base de acetona y se enjuagaron. Las muestras de suero de prueba se diluyeron 2 veces directamente en las placas fijadas con CRCoV. Las placas se incubaron durante 40-60 minutos. Se enjuagaron las placas y se agregó anticuerpo conjugado con IgG FITC anti-canino de conejo. Las placas se incubaron durante 40-60 minutos. Después de la incubación, las placas se enjuagaron y se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia. El título de anticuerpos se determinó como el recíproco de la dilución de suero más alta que exhibe una intensidad de fluorescencia típica (+1) o más.
- Las muestras de suero se analizaron para anticuerpos de neutralización de suero CRCoV mediante neutralización de suero. En resumen, las células HRT18G se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a la densidad apropiada, y se incubaron durante 3-5 días a  $35\text{-}37^\circ\text{C}$  en una incubadora de  $\text{CO}_2$  humidificada. Cuando la monocapa celular alcanzó el 100% de confluencia, los pocillos se enjuagaron con medios y se pretrataron con medios suplementados con tripsina durante 1 hora en la incubadora. Se prepararon diluciones dobles de cada suero de prueba, y se incubaron con 50-300  $\text{TCID}_{50}$  CRCoV durante 40-60 minutos a temperatura ambiente. Se inocularon mezclas de suero y virus de cada dilución de suero en cuatro pocillos. Las placas se incubaron durante 5-7 días a  $35\text{-}37^\circ\text{C}$  en una incubadora de  $\text{CO}_2$  humidificada. Después de la incubación, los medios se descartaron, y las monocapas celulares se fijaron con una solución a base de acetona. Se descartó el fijador y se enjuagaron las placas. La presencia de CRCoV se determinó por inmunofluorescencia,

usando un anticuerpo conjugado con FITC específico de CRCoV, bajo un microscopio de epifluorescencia. El título de anticuerpos neutralizantes en suero se determinó como el recíproco de la mayor dilución en suero que neutralizó el virus en el 50% de los pocillos.

5 Las variables de eficacia principales fueron la presencia/ausencia de epitelio traqueal ciliado dañado puntuada con un grado > 1 (histopatología de la tráquea), y el aislamiento del virus. No se realizaron pruebas de hipótesis. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de las puntuaciones de histopatología (gravedad, distribución, procedimiento y cilios) de la tráquea, la cavidad nasal y el lóbulo craneal pulmonar para cada grupo de tratamiento. Además, el epitelio ciliado traqueal se clasificó además como normal (0 y 1) o anormal (2, 3 y 4). Las distribuciones de frecuencia de esta variable se calcularon para cada tratamiento. Las distribuciones de frecuencia de la presencia o ausencia de aislamiento del virus CRCoV de los hisopos nasales y orofaríngeos se calcularon para cada grupo de tratamiento y punto de tiempo. Se calculó el número de días que un animal tuvo el virus CRCoV detectado en los hisopos nasales después del desafío [(virus del último día detectado - virus del primer día detectado) +1 a menos que no se detecte virus] para cada animal. El número de días con el virus detectado de los hisopos nasales se resumió para cada tratamiento, con estadísticas descriptivas que incluyeron la media, la mediana, la desviación estándar, el mínimo y el máximo. Las distribuciones de frecuencia de la presencia/ausencia de aislamiento del virus del lavado y los datos tisulares se calcularon para cada grupo de tratamiento. Las estadísticas descriptivas de los títulos de anticuerpos (IFA y SN), incluyendo la media geométrica, mínima y máxima, se calcularon para cada tratamiento y punto de tiempo. Se calcularon las distribuciones de frecuencias de cada observación clínica (secreción nasal, tos, estornudos, secreción ocular, conjuntivitis y depresión) para cada grupo de tratamiento y punto de tiempo. Las estadísticas descriptivas se calcularon para la temperatura, incluyendo la media, la desviación estándar, el mínimo y el máximo para cada tratamiento y punto de tiempo. Además, las temperaturas se clasificaron como <37,0 °C, 37,0-39,5 °C, 39,6-40,0 °C, 40,1-41,0 °C y 41,1-42,0 °C. Las distribuciones de frecuencia se calcularon para cada tratamiento y tiempo de esta nueva variable. Las distribuciones de frecuencia de presencia/ausencia de cada prueba se calcularon para cada tratamiento y tiempo.

30 Resultados. Todos los perros dieron negativo para el aislamiento del virus CRCoV de muestras de hisopos nasales y orofaríngeos recolectados el día 0 (antes de la administración de desafío). Todos los perros dieron negativos (<40 título IFA) para anticuerpos CRCoV por ensayo fluorescente indirecto, y negativo (título 3 SN) para anticuerpos CRCoV por ensayo de neutralización en suero, de muestras de suero recogidas el día 0 (antes de la administración de desafío). Todos los perros dieron negativo para *Bordetella bronchiseptica* y para *Pasteurella sp* de hisopos nasales y orofaríngeos recolectados el día 0, pero *Mycoplasma sp*, *Staphylococcus intermedius* y *Streptococcus canis* se aislaron de hisopos nasales y orofaríngeos a diferentes niveles en el día 0. Los perros sanos con frecuencia albergan estos microorganismos como parte de su flora normal en el tracto respiratorio superior, sin embargo.

35 La mayoría de los signos clínicos posteriores a la exposición para los animales que recibieron CRCoV Max aislado (grupos de tratamiento T03 y T04) y CRCoV NP787 aislado (grupos de tratamiento T05 y T06), fueron de leves a moderados, e incluyeron secreción nasal, tos, estornudos y secreción ocular. Nunca se observó conjuntivitis, y un solo perro presentó depresión. Al parecer, no hubo diferencias importantes entre los dos aislados de desafío (CRCoV Max y CRCoV NP787) asociados con la patogenicidad de los signos clínicos observados para los grupos de tratamiento T03 y T04 (desafiados con CRCoV Max aislado), y para los grupos de tratamiento T05 y T06 (desafiados con CRCoV NP787 aislado).

45 Algunos perros que recibieron el placebo (solución salina) en los grupos de tratamiento T01 y T02, presentaron secreción ocular leve y moderada durante la fase de desafío del estudio. Sin embargo, todos estos perros ya presentaban secreción ocular leve antes del día 0 de desafío. Las temperaturas timpánicas después del desafío fueron normales ( $\leq 39,4$  °C) para todos los perros desafiados con el CRCoV Max aislado (grupos de tratamiento T03 y T04), y para todos los perros desafiados con CRCoV NP787 aislado (grupos de tratamiento T05 y T06). Algunos perros que recibieron el placebo en los grupos de tratamiento T01 y T02 presentaron hipertermia ( $\geq 39,5$  °C) en algún momento durante la fase de desafío del estudio. Sin embargo, todos estos perros eran perfectamente normales y saludables, y más tarde se descubrió que el termómetro timpánico usado para los grupos de tratamiento T01 y T02 estaba funcionando alto.

En resumen, debido a la intensidad leve de los signos clínicos de CRCoV, y debido a la ausencia de hipertermia en los perros de desafío (CRCoV Max aislado y CRCoV NP787 aislado), estos dos criterios no parecen ser suficientes para caracterizar y medir la intensidad de la enfermedad en condiciones de laboratorio.

55 El número medio de días de aislamiento del virus CRCoV de los hisopos nasales para el grupo de tratamiento T03 (CRCoV Max aislado, la necropsia del día 4) fue 4, y para el grupo de tratamiento T04 (CRCoV Max aislado, la necropsia del día 14) fue 6. El número medio de días de aislamiento del virus CRCoV de los hisopos nasales para el Grupo de tratamiento T05 (CRCoV NP787 aislado, la necropsia del día 4) fue 2, y para el grupo de tratamiento T06 (CRCoV NP787 aislado, la necropsia del día 14) fue 5. Cuatro perros que recibieron el placebo (solución salina) del grupo de tratamiento T02 fueron positivos para el aislamiento del virus CRCoV de los hisopos nasales alrededor del día 6, día 7 y día 8 después del desafío. Ninguno de estos animales presentó

signos clínicos sugestivos de infección por CRCoV durante la fase después del desafío. En la necropsia, el día 14 después del desafío, tres perros T02 tuvieron puntuaciones pulmonares leves generales. La evaluación de los cilios se consideró normal para todos estos animales. No se obtuvo aislamiento CRCoV de pulmón, lavado pulmonar, cavidad nasal y tráquea para todos estos animales, y por esta razón, es poco probable que el aislado CRCoV de tipo salvaje se haya contaminado de forma cruzada en la sala de animales con placebo (solución salina). Además, los resultados positivos de aislamiento del virus CRCoV solo se encontraron en el segundo pase en las células HRT18G. Una posibilidad es que las muestras fueron contaminadas de forma cruzada en la fase de prueba de laboratorio.

El número medio de días de aislamiento del virus CRCoV de los hisopos orofaríngeos para el grupo de tratamiento T03 (CRCoV Max aislado, la necropsia del día 4) fue 2, y para el grupo de tratamiento T04 (CRCoV Max aislado, la necropsia del día 14) fue 2. El número medio de días de virus CRCoV de hisopos orofaríngeos para el grupo de tratamiento T05 (CRCoV NP787 aislado, la necropsia del día 4) fue 0, y para el grupo de tratamiento T06 (CRCoV NP787 aislado, la necropsia del día 14) fue 1. Los días medios numéricamente más altos de aislamiento de CRCoV se obtuvieron de los hisopos recogidos de la cavidad nasal usando el CRCoV Max aislado como organismo de desafío (grupos de tratamiento T03 y T04). En conclusión, los hisopos nasales recolectados durante la fase más temprana de la infección parecían tener más probabilidades de dar como resultado un aislamiento positivo del virus CRCoV en perros desafiados con el CRCoV Max aislado.

No se observó aislamiento del virus CRCoV del tejido pulmonar recogido de los perros desafiados con placebo (solución salina). Se observó un aislamiento positivo del virus CRCoV del tejido pulmonar en 10 de cada 10 perros (100%) en la necropsia del día 4 para el grupo de tratamiento T03 (CRCoV Max aislado). Se observó un aislamiento positivo del virus CRCoV del tejido pulmonar en 7 de cada 10 perros (70%) en la necropsia del día 4 para el grupo de tratamiento T05 (CRCoV NP787 aislado). No se obtuvo aislamiento del virus CRCoV del tejido pulmonar recogido en la necropsia del día 14 para el grupo de tratamiento T04 (CRCoV Max aislado) o para el grupo de tratamiento T06 (CRCoV NP787 aislado).

No se observó aislamiento del virus CRCoV del lavado pulmonar recogido de los perros desafiados con placebo (solución salina). El aislamiento positivo del virus CRCoV del lavado pulmonar se observó en 10 de cada 10 perros (100%) en la necropsia del día 4 para el grupo de tratamiento T03 (CRCoV Max aislado) y el grupo de tratamiento T05 (CRCoV NP787 aislado). No se obtuvo aislamiento del virus CRCoV del lavado pulmonar recogido en la necropsia del día 14 para el grupo de tratamiento T04 (CRCoV Max aislado) o el grupo de tratamiento T06 (CRCoV NP787 aislado).

No se observó aislamiento del virus CRCoV de la cavidad nasal recogida de los perros desafiados con placebo (solución salina). El aislamiento positivo del virus CRCoV de la cavidad nasal se observó en 10 de cada 10 perros (100%) en la necropsia del día 4 para el grupo de tratamiento T03 (CRCoV Max aislado) y el grupo de tratamiento T05 (CRCoV NP787 aislado). No se obtuvo aislamiento del virus CRCoV de la cavidad nasal recolectada en la necropsia del día 14 para el grupo de tratamiento T04 (CRCoV Max aislado) o el grupo de tratamiento T06 (CRCoV NP787 aislado).

No se observó aislamiento del virus CRCoV de la tráquea recogida de los perros desafiados con placebo (solución salina). Se observó un aislamiento positivo del virus CRCoV de la tráquea en 10 de cada 10 perros (100%) en la necropsia del día 4 para el grupo de tratamiento T03 (CRCoV Max aislado) o el grupo de tratamiento T05 (CRCoV NP787 aislado). No se obtuvo aislamiento del virus CRCoV de la tráquea recogida en la necropsia del día 14 para el grupo de tratamiento T04 (CRCoV Max aislado) y para el grupo de tratamiento T06 (CRCoV NP787 aislado).

Ambos aislados de desafío (CRCoV Max y CRCoV NP787) se aislaron con éxito de pulmón, lavado pulmonar, cavidad nasal y tráquea recogidos en la necropsia del día 4. No se obtuvo aislamiento del virus CRCoV de pulmón, lavado pulmonar, cavidad nasal y tráquea recogidos en la necropsia del día 14 para ambos aislados de desafío (CRCoV Max y CRCoV NP787). En conclusión, el pulmón, el lavado pulmonar, la cavidad nasal y la tráquea recolectados durante la fase más temprana de la infección parecen tener más probabilidades de dar como resultado un aislamiento positivo del virus CRCoV.

No se observaron cambios patológicos clínicamente significativos en los epitelios ciliados del tejido pulmonar. La mayoría de los perros en todos los grupos de tratamiento obtuvieron un grado 0. Un solo perro en el grupo de tratamiento T03 (CRCoV Max aislado) en la necropsia del día 4 obtuvo un grado 1.

No se observaron cambios patológicos clínicamente significativos en los epitelios ciliados de la cavidad nasal para los grupos de tratamiento T01 y T02 (solución salina) en la necropsia de los días 4 y 14, respectivamente. Para el grupo de tratamiento T03 (CRCoV Max aislado) en la necropsia del día 4, los 10 perros presentaron patología de grado 2 o más. Para el grupo de tratamiento T04 (CRCoV Max aislado) en la necropsia del día 14, 6 de cada 10 perros (60%) presentaron patología de grado 2 o más. Para el grupo de tratamiento T05 (CRCoV NP787 aislado) en la necropsia del día 4, 9 de cada 10 perros (90%) mostraron patología de grado 2 o más. Para el grupo de tratamiento T06 (CRCoV NP787 aislado) en la necropsia del día 14, 7 de cada 10 perros (70%) presentaron patología de grado 2.

No se observaron cambios patológicos clínicamente significativos en los epitelios ciliados de la tráquea para los grupos de tratamiento T01 y T02 (solución salina) en la necropsia de los días 4 y 14, respectivamente. Para el grupo de tratamiento T03 (CRCoV Max aislado) en la necropsia del día 4, 7 de cada 10 perros (70%) presentaron patología de grado 2 o más. Para el grupo de tratamiento T04 (CRCoV Max aislado) en la necropsia del día 14, los 10 perros (100%) mostraron grado de patología 1. Para el grupo de tratamiento T05 (CRCoV NP787 aislado) en la necropsia del día 4, los 10 perros (100%) mostraron el grado de patología 2 o más. Para el grupo de tratamiento T06 (CRCoV NP787 aislado) en la necropsia del día 14, los 10 perros (100%) mostraron patología grado 1. No se observaron cambios patológicos de grado 2 o más en el pulmón de los animales desafiados con ambos aislados de desafío (CRCoV Max y CRCoV NP787). Se observaron cambios patológicos de grado 2 o más en el epitelio ciliado de la cavidad nasal y la tráquea en animales desafiados con ambos aislados de desafío (CRCoV Max y CRCoV NP787). La mayoría de los cambios patológicos (grado 2 o más) en la cavidad nasal y en la tráquea se observaron en la necropsia del día 4. En conclusión, se observó daño del epitelio ciliado en la cavidad nasal y en la tráquea de los animales desafiados con ambos aislados (CRCoV Max y CRCoV NP787) y estos hallazgos patológicos parecían ser más pronunciados durante la fase más temprana de la infección (necropsia del día 4).

El hallazgo histopatológico más destacado fue la inflamación multifocal del pulmón, la cavidad nasal y la tráquea, en diferentes grados.

Todos los perros dieron negativo (<40 IFA) para anticuerpos CRCoV por ensayo fluorescente indirecto de muestras de suero recogidas en el día 4. Todos los perros de desafío con placebo (solución salina) dieron negativo (<40 IFA) para anticuerpos CRCoV por ensayo fluorescente indirecto de muestras de suero recolectadas el día 14. Los perros en el grupo de tratamiento T04 (CRCoV Max aislado), en la necropsia del día 14, tenían 1040 títulos de anticuerpos IFA de media geométrica de las muestras de suero recolectadas. Los perros en el grupo de tratamiento T06 (CRCoV NP787 aislado 0, en la necropsia del día 14, tenían 1689 títulos de anticuerpos IFA de media geométrica de muestras de suero recolectadas.

Todos los perros resultaron negativos (título de SN 3) para anticuerpos neutralizantes de CRCoV por ensayo de neutralización de suero de muestras de suero recogidas en el día 4. Todos los perros de desafío con placebo (solución salina) dieron negativo (título de SN 3) para anticuerpos neutralizantes de CRCoV mediante ensayo de neutralización de suero de muestras de suero recolectadas el día 14. Los perros en el grupo de tratamiento T04 (CRCoV Max aislado), en la necropsia del día 14, tuvieron 100 títulos de anticuerpos SN de media geométrica de las muestras de suero recolectadas. Los perros en el grupo de tratamiento T06 (CRCoV NP787 aislado), en la necropsia del día 14, tenían 34 títulos de anticuerpos SN de media geométrica de las muestras de suero recolectadas.

Todos los perros dieron negativo a *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella sp*, *Staphylococcus intermedius* y *Streptococcus canis* del lavado pulmonar y tejido pulmonar recogido en las necropsias ya sea del día 4 o del día 14. *Mycoplasma sp* se aisló del lavado pulmonar de 2 perros que recibieron la solución salina placebo (grupos de tratamiento T01 y T02). *Mycoplasma sp* se aisló del lavado pulmonar de 3 perros que recibieron CRCoV Max aislado (grupo de tratamiento T03). *Mycoplasma sp* también se aisló del tejido pulmonar de 1 perro que recibió CRCoV Max aislado (grupo de tratamiento T03). Estos perros no tenían indicación de neumonía bacteriana en la necropsia. Todos los perros dieron negativo para el aislamiento del virus CRCoV de los hisopos nasales y orofaríngeos recogidos el día 0 (antes de la administración de desafío). Todos los perros dieron negativo para anticuerpos CRCoV (IFA y SN) de muestras de suero recogidas en el día 0 (antes de la administración de desafío). Todos los perros dieron negativo para *Bordetella bronchiseptica* de hisopos nasales y orofaríngeos recogidos el día 0 (antes de la administración de desafío). De este modo, se cumplieron los criterios de inclusión para el estudio.

Conclusiones. Todos los perros desafiados con el CRCoV Max aislado dieron positivo para el aislamiento del virus de los hisopos nasales y los hisopos orofaríngeos durante la fase después del desafío. Todos los perros desafiados con CRCoV NP787 aislado dieron positivo para el aislamiento del virus de los hisopos nasales, y el 40-50% de los perros dieron positivo para el aislamiento del virus de los hisopos orofaríngeos durante la fase después del desafío. Por lo tanto, este estudio tuvo un desafío válido.

Todos los perros desafiados con el CRCoV Max aislado dieron positivo para el aislamiento del virus del pulmón, lavado pulmonar, cavidad nasal y tráquea en la necropsia del día 4. Todos los perros desafiados con el CRCoV NP787 aislado dieron positivo para el aislamiento del virus del lavado pulmonar, cavidad nasal, tráquea y el 70% de los perros dieron positivo para el aislamiento del virus del pulmón en la necropsia del día 4. Una vez más, esto confirma que este estudio tuvo un desafío válido.

La mayoría de los signos clínicos después del desafío para los animales que recibieron CRCoV Max aislado (grupos de tratamiento T03 y T04) y CRCoV NP787 aislado (grupos de tratamiento T05 y T06) fueron de leves a moderados, e incluyeron secreción nasal, tos, estornudos y secreción ocular. La conjuntivitis y la hipertermia ( $\geq 39,5$  °C) nunca se observaron, y un solo perro presentó depresión. Los signos clínicos y las temperaturas timpánicas no parecen ser suficientes para caracterizar y medir la intensidad de la enfermedad inducida por CRCoV en condiciones de laboratorio.

Los días medios numéricamente más altos de aislamiento de CRCoV se obtuvieron de los hisopos recogidos de la cavidad nasal usando el CRCoV Max aislado. Los hisopos nasales recolectados durante la fase más temprana de la infección parecían ser más propensos a producir un aislamiento positivo del virus CRCoV.

5 Ambos aislados de desafío (CRCoV Max y CRCoV NP787) se aislaron con éxito de pulmón, lavado pulmonar, cavidad nasal y tráquea recogidos en la necropsia del día 4. No se obtuvo aislamiento del virus CRCoV de pulmón, lavado pulmonar, cavidad nasal y tráquea recogidos en la necropsia del día 14 para ambos aislados de desafío (CRCoV Max y CRCoV NP787). En conclusión, las muestras de pulmón, lavado pulmonar, cavidad nasal y tráquea recolectadas durante la fase más temprana de infección parecen tener más probabilidades de dar como resultado un aislamiento positivo del virus CRCoV.

10 No se observaron cambios patológicos de grado 2 o más en el pulmón de animales desafiados con ambos aislados de desafío (CRCoV Max y CRCoV NP787). Se observaron cambios patológicos de grado 2 o más en el epitelio ciliado de la cavidad nasal y la tráquea en animales que recibieron el aislamiento de desafío (CRCoV Max y CRCoV NP787). La mayoría de los cambios patológicos (grado 2 o más) en la cavidad nasal y en la tráquea se observaron en la necropsia del día 4. En conclusión, se observó daño del epitelio ciliado en la cavidad nasal y en la tráquea de los animales desafiados con los aislados (CRCoV Max y CRCoV NP787), y estos hallazgos patológicos parecen ser más pronunciados durante la fase más temprana de la infección (necropsia del día 4).

20 Todos los perros dieron negativo para *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella sp*, *Staphylococcus intermedius* y *Streptococcus canis* del lavado pulmonar y el tejido pulmonar recogido en las necropsias del día 4 o del día 14. *Mycoplasma sp* se aisló de los pulmones (lavado o tejido) de 6 perros; sin embargo, no se observó neumonía bacteriana en la necropsia. En general, CRCoV fue el único patógeno aislado del tracto respiratorio, y parece ser responsable de los signos clínicos observados y la histopatología.

25 En conclusión, el CRCoV Max aislado o el CRCoV NP787 aislado, administrado mediante tratamiento por aerosoles, dio como resultado infección viral y replicación viral en el huésped natural. CRCoV se aisló de hisopos nasales, hisopos orofaríngeos, pulmón, lavado pulmonar, cavidad nasal y tráquea de perros desafiados. La mayoría de los signos clínicos fueron leves y no relevantes para la caracterización de la enfermedad. Sin embargo, el daño en el epitelio ciliado de la tráquea y la cavidad nasal parecen ser parámetros consistentes usados para caracterizar la enfermedad en condiciones de laboratorio. El modelo de desafío CRCoV y los aislados de desafío son apropiados para su uso en estudios de eficacia de vacunas para la fracción CRCoV.

30 Ejemplo 2. Desarrollo del coronavirus respiratorio canino (CRCoV), modelo de infección dual de *Bordetella bronchiseptica*.

35 Treinta perros, todos con buena salud general, se incluyeron en el estudio. Todos los animales fueron negativos para anticuerpos contra CRCoV según lo determinado por el ensayo de anticuerpos inmunofluorescentes (IFA) a <40 títulos de IFA en el cribado previo, y negativos (título de SN 3) para anticuerpos neutralizantes de suero para CRCoV antes del desafío con CRCoV (Día 0). Todos los perros también fueron negativos para el aislamiento de CRCoV de los hisopos nasales antes del desafío con CRCoV (Día 0). Todos los animales no fueron vacunados contra *Bordetella*, y tenían títulos bajos de anticuerpos (<16 títulos MAT) para *Bordetella* según lo determinado por la Prueba de Micro Aglutinación (MAT) antes del desafío con *Bordetella* (Día 3). Todos también estaban libres de *Bordetella*, según lo determinado por la prueba de aislamiento de hisopos nasales bacterianos, antes del desafío con CRCoV (Día 0).

**Tabla 2. Diseño del estudio**

Grupo de tratamiento	Desafío	N	Dosis diana/Perro	Día de estudio	Ruta
T01	Solución salina	10	NA	0	tratamiento por aerosoles intranasal a través de la cámara
T02	<i>Bordetella</i> (gato Bihl) (051397-85B-2)	10	10 <sup>9,0</sup> CFU	3	
T03	CRCoV (Max p1) CM (NB120586-123)	10	10 <sup>6,0</sup> TCID <sub>50</sub>	0	
	<i>Bordetella</i> (gato Bihl) (051397-85B-2)		10 <sup>9,0</sup> CFU	3	

El aislado CRCoV, designado Max, se usó como material de desafío. El virus se propagó y tituló en células HRT-18G, y se determinó que tenía un título de  $10^{7.1}$  TCID<sub>50</sub>/ml. Se usó la cepa de gato Bihir de *Bordetella bronchiseptica* como material de desafío.

5 Se observaron animales al menos una vez al día desde la llegada hasta el día -3. Se recogieron muestras de sangre el día 0 antes de la administración del desafío CRCoV, y el día 3, antes de la administración del desafío *Bordetella*. Las temperaturas timpánicas se determinaron el día -2, el día -1 y el día 0. Se recogieron tres tipos de hisopos nasales de cada perro antes del desafío Día 0: uno se recogió en tubos de medios de transporte de vial (VTM) para el aislamiento del virus CRCoV; el segundo recogido en medio Amies para examen bacteriano; y el  
10 tercero recogido en caldo de triptosa fosfato (TPB) para el aislamiento de *Bordetella*. Se recogió un conjunto adicional el día 3 antes de la administración de desafío de *Bordetella*, para el aislamiento de *Bordetella*. Los perros se observaron dos veces al día el día -2, el día -1 y el día 0 (antes de la administración de desafío), para detectar signos clínicos de enfermedad respiratoria para establecer los valores de referencia.

15 El día 0, los perros en el grupo de tratamiento T01 recibieron solución salina estéril mediante tratamiento por aerosoles en una cámara de plexiglás durante aproximadamente 30 minutos. También en el día 0, a los perros en el grupo de tratamiento T03 se les administró CRCoV mediante tratamiento por aerosoles en una cámara de plexiglás durante aproximadamente 30 minutos. El día 3, los perros en los grupos de tratamiento T02 y T03 fueron desafiados con *Bordetella* mediante tratamiento por aerosoles en la cámara de plexiglás durante 30 minutos.

20 Las observaciones clínicas (aproximadamente 30 minutos) se realizaron una vez el día 0, y luego dos veces al día (aproximadamente 30 minutos cada sesión) del día 1 al día 23. El día 3, las observaciones se realizaron antes y después del desafío con *Bordetella*. El día 24, se realizó una sola observación. Las temperaturas timpánicas se determinaron diariamente después del desafío CRCoV, desde el día 0 hasta el día 24. Se recogieron dos tipos de hisopos nasales de cada perro después de la administración del desafío: uno se recogió en tubos VTM para el aislamiento del virus CRCoV desde el día 1 hasta el día 10; y el segundo se recogió en  
25 caldo de triptosa fosfato (TPB) para el aislamiento de *Bordetella*, comenzando el día 6, aislando dos veces por semana durante tres semanas, y luego el día 24. Se recolectó otro conjunto de muestras de hisopos antes de la necropsia del día 24 en medio Amies, sin carbón, para examen bacteriano. Se recogieron muestras de sangre (aproximadamente 6 ml) para serología en tubos SST el día 3, antes del desafío con *Bordetella* y el día 24.

30 La necropsia se realizó el día 24 después del desafío. Los perros fueron sacrificados con una sobredosis de barbiturato de sodio. En la necropsia, se extirpó asépticamente un pulmón completo y se colocó sobre un paño estéril. Para determinar la cantidad total de consolidación pulmonar, cada lóbulo pulmonar se calificó por separado. Se cortó la tráquea, y se evaluó la luz en busca de patología macroscópica. Todos los tejidos fueron evaluados y calificados por un patólogo veterinario certificado. Después de que se puntuaron los pulmones, el lóbulo de caudal pulmonar derecho se lavó con un lavado de aproximadamente 30,0 ml de VTM (sin antibiótico ni  
35 antimicótico) a través del plexo bronquial. El medio VTM se aspiró lentamente de vuelta a la jeringa mientras se masajeara suavemente el tejido pulmonar. Los líquidos lavados se dividieron en alícuotas y se analizaron para determinar su bacteriología, así como para el aislamiento del virus CRCoV. Se recogieron muestras de tejido de la tráquea, la cavidad nasal (incluyendo la sección ciliada) y el lóbulo craneal derecho. Se recogieron dos conjuntos de muestras de tejido de la tráquea y la cavidad nasal. Un conjunto se probó para el aislamiento del  
40 virus CRCoV, y el otro conjunto se preparó para histopatología. Se recogieron dos conjuntos de muestras de tejido del lóbulo craneal derecho del pulmón. El primer conjunto fue probado para bacteriología, y el segundo conjunto fue probado para aislamiento de virus CRCoV. Se preparó un conjunto de muestras de tejido, recogidas del lóbulo medio izquierdo del pulmón, para histopatología.

45 Se recogieron hisopos nasales, para aislamiento de *Bordetella*, el día 0 antes del desafío CRCoV, el día 3 antes del desafío *Bordetella*, comenzando el día 6 y aislando dos veces por semana durante tres semanas, y el día 24. Dos hisopos Calgiswab se usaron por perro, un hisopo por cada fosa nasal. Se recogió sangre para serología (CRCoV por IFA/SN, y *Bordetella* por MAT) antes del desafío CRCoV (Día 0), antes del desafío *Bordetella* (Día 3) y al final del estudio (Día 24). Se recogieron aproximadamente 6 ml de sangre de cada perro en cada punto de tiempo. El suero se separó de la sangre completa y se decantó en dos crioviales. Se usaron hisopos Dacron  
50 estériles para la recolección de hisopos nasales para el aislamiento del virus. Los hisopos se recolectaron el día 0, antes del desafío CRCoV, el día 3, antes del desafío *Bordetella*, y del día 1 al día 10. Se insertó suavemente un hisopo en cada fosa nasal (un hisopo por perro) y luego se colocó en tubos de recolección estériles que contiene aproximadamente 3 ml de medio de transporte viral (VTM suplementado con antibióticos). Se recogieron hisopos nasales de cada perro el día 0 (antes de la administración de desafío) y el día 24 (antes de la  
55 necropsia). Los hisopos se colocaron en medio de transporte Amies sin carbón.

60 Para el ensayo de anticuerpos contra *Bordetella*, los anticuerpos de aglutinación contra *Bordetella* se determinaron mediante la Prueba de Microaglutinación de Antígeno Particular (Micro) (MAT). En resumen, se prepararon diluciones en serie de dos veces de suero de prueba, suero positivo conocido, suero negativo usando una placa de microtitulación inferior en "v", usando solución salina normal que contiene 0,05% de tween 20 como diluyente. Se agregaron muestras de suero como 50 µl por pocillo. Se añadieron 50 µl de antígeno de *Bordetella*

a cada pocillo y se mezclaron durante 60 segundos en un mezclador de placa de microtitulación. Las placas se incubaron a  $37 \pm 2$  °C, durante 2 horas y luego durante 20-48 horas a 2-8 °C. Las placas fueron leídas visualmente en un soporte de espejo. Los títulos se expresaron como el recíproco de la dilución más alta que muestra aglutinación completa.

5 Para el ensayo indirecto de anticuerpos fluorescentes CRCoV, las muestras de suero se titularon para anticuerpos anti-CRCoV por IFA. En resumen, las células HRT-18G se sembraron en placas de 96 pocillos y se infectaron con una cantidad óptima de CRCoV, para obtener entre 50-200 células infectadas por pocillo. Las placas infectadas se fijaron con un fijador a base de acetona, se enjuagaron y se almacenaron. Las muestras de suero de prueba se diluyeron en serie 2 veces directamente en las placas fijadas con antígeno, y se incubaron durante 40-60 minutos. Se desechó el suero de prueba, se enjuagaron las placas y se agregó conjugado con IgG FA anti-canino de conejo y se incubó durante 40-60 minutos. Luego se enjuagaron los pocillos y se examinaron las placas para detectar fluorescencia bajo el microscopio. El título de anticuerpos se determinó como el recíproco de la dilución de suero más alta que exhibe fluorescencia típica (+1) o más intensa.

15 Para el ensayo de neutralización de suero CRCoV, se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizantes de suero CRCoV en células HRT-18G. En resumen, se sembraron células HRT-18G en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a la densidad apropiada y se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> a  $36 \pm 1$  °C durante 3-5 días. Cuando las monocapas celulares en los pocillos eran 100% confluentes, los pocillos se enjuagaron con medio y se pretrataron con medio suplementado con tripsina durante al menos 1 hora en la incubadora. Se prepararon diluciones dobles de cada suero de prueba, y se incubaron con 50-422 TCID<sub>50</sub> CRCoV durante 40-60 minutos a temperatura ambiente. Las mezclas de suero y virus de cada dilución de suero se inocularon en dos pocillos. Las placas se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> humidificada (3-5% de CO<sub>2</sub>) a 35-37 °C, durante 5-7 días. Cuando se completó la incubación, las placas se fijaron, se tiñeron con anticuerpo conjugado CRCoV específico-FITC y se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia. El título de anticuerpos neutralizantes en suero se determinó como el recíproco de la mayor dilución en suero que neutralizó el virus en el 50% de los pocillos.

25 Para el aislamiento de CRCoV, se analizaron muestras de hisopos nasales, tejidos y lavado de pulmón para determinar la presencia de CRCoV en células HRT-18G. En resumen, las muestras se procesaron y se inocularon en matraces sembrados con células HRT-18G. Las muestras nasales se inocularon en matraces T-25. Se inocularon muestras de lavado de tejido y pulmón en matraces T-150. Los matraces inoculados se incubaron durante la noche en una incubadora de CO<sub>2</sub> a  $36 \pm 1$  °C. Luego, se agregó suero fetal bovino (FBS) a cada matraz (80 µl por matraz T-25 o 500 µl por matraz T-150). Los matraces se incubaron durante aproximadamente 7 días en una incubadora de CO<sub>2</sub> a  $36 \pm 1$  °C. Luego se recogieron muestras y se inocularon en células HRT en placas de 96 pocillos. Se inocularon cuatro pocillos de la placa con 120 µl/pocillo y se inocularon 4 pocillos adicionales con 30 µl/pocillo. Las placas de 96 pocillos se incubaron durante 5 a 7 días en una incubadora de CO<sub>2</sub> a  $36 \pm 1$ , y luego se fijaron con un fijador a base de acetona, y luego se tiñeron con tinción CRCoV FA (todos los pocillos). La presencia de virus en la muestra se declaró cuando se observó fluorescencia típica (células CRCoV FA-positivas) bajo el microscopio.

40 Para la titulación del virus de desafío CRCoV, el título del material de desafío se determinó en HRT-18G. En resumen, las células HRT-18G se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a la densidad apropiada, y se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> a  $36 \pm 1$  °C durante 3-5 días. Cuando la monocapa celular era 100% confluyente, los pocillos se enjuagaron con medio y se pretrataron con medio suplementado con tripsina durante 1 hora en la incubadora de CO<sub>2</sub>. La muestra de prueba diluida en serie diez veces se inoculó en los pocillos en 6 repeticiones por dilución. Las placas se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> humidificada (3-5% de CO<sub>2</sub>) durante 5-7 días a 35-37 °C. Después de la incubación, los medios se descartaron y las células se incubaron durante 20-40 minutos con un fijador a base de acetona a temperatura ambiente. El fijador se descartó y las placas se enjuagaron dos veces con agua. El anticuerpo conjugado CRCoV FITC se agregó a los pocillos y se incubó durante 40-60 minutos a temperatura ambiente. Cuando se completó la incubación, los pocillos se enjuagaron dos veces con agua antes de observar las placas bajo un microscopio de epifluorescencia para detectar la presencia de células infectadas con CRCoV. El punto final del 50% para la infectividad se calculó usando el procedimiento Spearman-Kärber y el título del virus se expresó como log<sup>10</sup> TCID<sub>50</sub>/ml.

50 Se evaluaron muestras de hisopos nasales, tejido pulmonar y lavado para determinar la presencia de *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma sp.*, *Streptococcus canis*, *Staphylococcus intermedius* y *Pasteurella sp.* de acuerdo con los procedimientos estándar.

Se prepararon portaobjetos para tejidos de cavidad nasal, pulmón y traqueal, y un patólogo certificado los evaluó para detectar lesiones histopatológicas.

55 Los criterios para una prueba válida son que todos los animales en el estudio deben estar: (i) libres de CRCoV por aislamiento de virus en el día 0; (ii) seronegativo para CRCoV en el día 0; (iii) libre de *Bordetella* en los días 0 y 3 (antes del desafío con *Bordetella*) por aislamiento bacteriano de hisopos nasales; y (iv) susceptibles a *Bordetella* antes del desafío, según lo determinado por el título de anticuerpos MAT que permanece  $\leq 16$  en el día 0.

Los signos clínicos respiratorios, incluyendo la tos, fueron los criterios primarios usados para juzgar la extensión de la enfermedad. El aislamiento bacteriano fue la variable secundaria de soporte.

Las distribuciones de frecuencia de las observaciones clínicas (secreción nasal, tos, estornudos, secreción ocular, arcadas, depresión y respiración) se calcularon para cada punto de tiempo y tratamiento. El número y el porcentaje de períodos de observación después del desafío en los que un animal tuvo un signo clínico particular (secreción nasal, tos, estornudos, secreción ocular, depresión, arcadas y respiración), y el número de días después del desafío con un signo clínico particular (Se calculó la secreción nasal, tos, estornudos, secreción ocular, depresión, arcadas y respiración) para cada animal. Para cada tratamiento se calcularon estadísticas descriptivas para los períodos porcentuales con signos clínicos y la duración de cada signo clínico, incluyendo la media, la mediana, la desviación estándar, los mínimos y los máximos. Los animales se clasificaron como con fiebre ( $\geq 39,5$  °C) o sin fiebre ( $<39,5$  °C) cada día. Las distribuciones de frecuencia de fiebre/sin fiebre se calcularon para cada tratamiento y punto de tiempo. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de la presencia o ausencia de aislamiento CRCoV de los hisopos nasales para cada grupo de tratamiento y punto de tiempo. Se calculó para cada animal el número de días que se detectó CRCoV en un hisopo nasal después del desafío (virus del primer día detectado hasta el último día detectado). Se calcularon las medias, medianas, desviaciones estándar, mínimos y máximos de tratamiento. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de la presencia/ausencia de aislamiento del virus a partir del lavado pulmonar, pulmones, cavidad nasal y tráquea para cada grupo de tratamiento. Se calcularon las distribuciones de frecuencia del aislamiento bacteriano (positivo/negativo) para cada tratamiento y punto de tiempo. También se determinó para cada animal si alguna vez tuvo bacterias aisladas después del desafío, y se calculó una distribución de frecuencias para cada tratamiento. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de cada tipo de puntaje de histopatología para la tráquea, la cavidad nasal y el lóbulo medio izquierdo del pulmón, para cada grupo de tratamiento. Además, la evaluación de los cilios traqueales se clasificó además como normal/histológicamente no relevante (0 y 1), o anormal/histológicamente relevante (2, 3 y 4), y se calcularon las distribuciones de frecuencia de esto para cada tratamiento.

La implicación pulmonar difusa, discreta y total se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de implicación} = 0,53 [(0,35 \times \text{lóbulo craneal derecho}) + (0,15 \times \text{lóbulo medio derecho}) + (0,40 \times \text{lóbulo caudal derecho}) + 0,10 \times \text{lóbulo accesorio}] + 0,47 [(0,30 \times \text{lóbulo craneal izquierdo}) + (0,25 \times \text{lóbulo medio izquierdo}) + (0,45 \times \text{lóbulo caudal izquierdo})]$$

Se calcularon estadísticas descriptivas que incluyen la media, la mediana, la desviación estándar, el mínimo y el máximo para cada tratamiento y tipo de implicación pulmonar. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de la presencia de lesiones graves, decoloración y aumento de las secreciones para cada grupo de tratamiento. Las medias geométricas del tratamiento, los mínimos y máximos de los títulos de anticuerpos se calcularon para cada punto de tiempo. Las distribuciones de frecuencia de la presencia/ausencia de *Bordetella* se calcularon para cada grupo de tratamiento y punto de tiempo.

**Resultados.** Todos los perros dieron negativo ( $<40$  título IFA) para anticuerpos CRCoV por ensayo fluorescente indirecto, y negativo (título 3 SN) para anticuerpos CRCoV por ensayo de neutralización de suero de muestras de suero recogidas en el día 0 (antes del desafío). Todos los perros dieron negativo para CRCoV por aislamiento del virus de muestras de hisopos nasales recogidos en el día 0 (antes del desafío). Todos los perros dieron negativo para anticuerpos de *Bordetella* ( $<16$ ) por prueba de microaglutinación de muestras de suero recolectadas en el día 21 y el día 0 (antes del desafío). Todos los perros dieron negativo para *Bordetella* y *Pasteurella sp.* De los hisopos nasales recogidos antes de la administración de desafío (Día 0). *Mycoplasma sp.*, *Staphylococcus pseudintermedius* y *Streptococcus canis* se aislaron a partir de hisopos nasales a diferentes niveles el día 0. (Estos variaron entre 0-80%, con porcentajes para *S. pseudintermedius* siendo el más alto, con 50-80%). Sin embargo, los perros saludables con frecuencia albergan estos microorganismos como parte de su flora normal en el tracto respiratorio superior. De este modo, se cumplieron los criterios de inclusión.

Las titulaciones realizadas en las muestras de prueba CRCoV recogidas durante la prueba confirmaron que  $10^{4,5}$  TCID<sub>50</sub> aerosolizado por perro en la cámara. El recuento de placas realizado al inicio y al final de la inoculación de desafío confirmó que un promedio de  $5 \times 10^8$  CFU de *Bordetella* fue aerosolizado por perro en la cámara.

Las temperaturas timpánicas después del desafío fueron normales ( $\leq 39,4$  °C) para todos los grupos de tratamiento. Se calculó la media, la desviación estándar, la mediana, el mínimo y el máximo para cada signo clínico individual (secreción nasal, tos, estornudos, secreción ocular, arcadas, depresión y respiración) para determinar si había alguna diferencia entre el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*) y el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*). Hubo un aumento en los períodos de tiempo porcentual con secreción nasal para los perros en el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*, media = 38,3) en comparación con los perros en el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*, media = 7,2). También hubo un aumento en los períodos de tiempo de porcentaje con secreción ocular para los perros en el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*, media = 25,1) en comparación con los perros en el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*, media = 9,6).

Todos los perros en el grupo de tratamiento T01 (placebo, solución salina), el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*) y el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*) dieron negativo (<40 título de IFA) para anticuerpos CRCoV por ensayo fluorescente indirecto, y negativo (título de SN 3) para anticuerpos CRCoV mediante ensayo de neutralización en suero de muestras de suero recogidas en el día 3. Todos los perros en el grupo de tratamiento T01 (placebo, solución salina) y el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*) dieron negativo (<40 título de IFA) para anticuerpos CRCoV por ensayo fluorescente indirecto y negativo (título de SN 3) para anticuerpos contra CRCoV mediante ensayo de neutralización en suero de muestras de suero recogidas el día 24. Todos los perros en el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*) dieron positivo para anticuerpos contra CRCoV mediante ensayo fluorescente indirecto (media geométrica del título de IFA = 3151,7), y positivo para anticuerpos CRCoV por ensayo de neutralización de suero (media geométrica del título de SN = 361,8) de muestras de suero recolectadas el día 24.

Todos los perros en el grupo de tratamiento T01 (placebo, solución salina), el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*) y el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*) dieron negativo a los anticuerpos de *Bordetella* ( $\leq 8$ ) por MAT de muestras de suero recogidas en el día 3. Todos los perros en el grupo de tratamiento T01 (Placebo, solución salina) dieron negativo a los anticuerpos de *Bordetella* (8) por MAT de muestras de suero recogidas el día 24. La mayoría de los perros (8 de cada 10) en el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*), y todos los perros en el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*), tenían anticuerpos contra *Bordetella* (16) por MAT (media geométrica del título MAT para T02 y T03 = 13,9) de muestras de suero recogidas el día 24.

El número medio de días de aislamiento del virus CRCoV de los hisopos nasales fue 0 para el grupo de tratamiento T01 (placebo, solución salina), 0 para el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*) y 6 para el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*). CRCoV no se aisló del lavado pulmonar, tejido pulmonar, cavidad nasal o tráquea en la necropsia del día 24 de ninguno de los grupos de tratamiento.

Se aisló *Bordetella* de los hisopos nasales recogidos los días 6, 9, 13, 16, 20, 23 y 24 del grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*) y el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*). Todos los perros en el grupo de tratamiento T01 (placebo, solución salina) dieron negativo para el aislamiento de *Bordetella* del lavado pulmonar y el tejido pulmonar recogido en el día 24. Todos los perros en el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*) y en el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*) dieron positivo para *Bordetella* del lavado pulmonar y del tejido pulmonar recolectado el día 24. *Mycoplasma sp.*, *Staphylococcus pseudintermedius* y *Streptococcus canis* se aislaron de hisopos nasales a diferentes niveles el día 24. Todos los perros en el grupo de tratamiento T01 (placebo, solución salina), grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*) y el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*) dieron negativo para *Pasteurella sp.* el día 24. Un solo perro en el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*) tenía *Mycoplasma sp.* aislado del lavado pulmonar. Todos los perros en el grupo de tratamiento T01 (placebo, solución salina), el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*) y el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*) dieron negativo para *Pasteurella sp.*, *Staphylococcus pseudintermedius* y *Streptococcus canis* del lavado pulmonar y del tejido pulmonar en la necropsia en el día 24.

Los animales desafiados con CRCoV y *Bordetella* (grupo de tratamiento T03) tuvieron una mayor incidencia y gravedad en las lesiones pulmonares macroscópicas y microscópicas que los animales expuestos únicamente a animales con *Bordetella* (grupo de tratamiento T02) y solución salina (placebo) (grupo de tratamiento T01). Las lesiones microscópicas traqueales y nasales tuvieron una prevalencia y gravedad similares en los grupos de tratamiento T02 y T03. La incidencia y la gravedad de las lesiones pulmonares observadas en animales con doble desafío sugirieron que la infección con CRCoV predispone a los perros a desarrollar neumonía después de la infección con *Bordetella*. Sin embargo, estos datos deben correlacionarse con análisis bacterianos y virales, así como con la presentación de signos clínicos en animales infectados.

Conclusiones. Se cumplieron los criterios de inclusión, en el sentido de que: (i) todos los perros estaban sanos y no recibieron ninguna vacuna de *Bordetella*; (ii) todos los perros fueron negativos para anticuerpos contra CRCoV (título de IFA <40), y negativos (título de SN 3) para anticuerpos neutralizantes de suero para CRCoV antes del desafío; (iii) todos los perros fueron negativos para el aislamiento de CRCoV de los hisopos nasales antes del desafío; y (iv) todos los perros tenían títulos bajos de anticuerpos (títulos de MAT  $\leq 8$ ) para *Bordetella*, y estaban libres de aislamiento de *Bordetella* de los hisopos nasales antes del desafío.

Los desafíos se consideraron satisfactorios, ya que: (i) todos los perros desafiados con CRCoV fueron positivos para el aislamiento del virus CRCoV de los hisopos nasales (Día 24); y (ii) todos los perros desafiados con *Bordetella* fueron positivos para el aislamiento de la bacteria de los hisopos nasales (Día 9).

Las temperaturas timpánicas después del desafío fueron normales ( $\leq 39,4$  °C) para los grupos de tratamiento T01 (placebo, solución salina), T02 (*Bordetella*) y T03 (CRCoV y *Bordetella*). Con respecto a los signos clínicos que se evaluaron durante la fase después del desafío (secreción nasal, tos, estornudos, secreción ocular, arcadas, depresión y respiración), se observaron aumentos en los períodos porcentuales de tiempo con secreción nasal para los perros en el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*, media = 38,3) en comparación con los perros en el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*, media = 7,2), y en los períodos de tiempo porcentuales con secreción ocular para los perros en el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*, media = 25,1) en comparación con perros en el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*, media = 9,6). Los otros signos clínicos (tos,

estornudos, arcadas, depresión y respiración) no parecían ser diferentes al comparar el grupo de tratamiento T02 (*Bordetella*) con el grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*).

5 Todos los perros en los grupos de tratamiento T02 (*Bordetella*) y T03 (CRCoV y *Bordetella*) dieron positivo para *Bordetella* de lavados pulmonares y de tejido pulmonar recogido al final del estudio (Día 24). CRCoV no se aisló del grupo de tratamiento T03 (CRCoV y *Bordetella*) lavados pulmonares, tejido pulmonar, cavidad nasal o muestras traqueales recogidos al final del estudio (día 24). Estudios internos previos han demostrado que CRCoV se aísla más fácilmente del lavado pulmonar y del tejido pulmonar dentro de la primera semana después del desafío. Todos los perros en los grupos de tratamiento T01 (placebo, solución salina), T02 (*Bordetella*) y T03 (CRCoV y *Bordetella*) dieron negativo para *Pasteurella sp.*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Mycoplasma sp.* (excepto un perro del grupo de tratamiento T03) y *Streptococcus canis* del lavado pulmonar y del tejido pulmonar recolectado al final del estudio (Día 24). Los medios de consolidación pulmonar difusos, discretos y totales fueron mayores para los animales desafiados con CRCoV y *Bordetella* (grupo de tratamiento T03). La incidencia y la gravedad de las lesiones pulmonares observadas en estos animales sugieren que la infección con CRCoV predispone a los perros a desarrollar neumonía después de la infección con *Bordetella*.

15 En general, los datos de secreción nasal/ocular y necropsia parecen indicar que la preinfección de perros con CRCoV aumenta la incidencia y la gravedad de la enfermedad respiratoria en una infección secundaria por *Bordetella*.

Ejemplo 3. Eficacia de una vacuna CRCoV contra desafío dual con CRCoV y *Bordetella bronchiseptica*.

20 Se incluyeron sesenta perros, todos con buena salud general, en el estudio. Todos los animales no habían recibido ninguna vacuna de *Bordetella* y, según lo determinado por la Prueba de Micro Aglutinación (MAT), tenían anticuerpos de bajo nivel (títulos de MAT  $\leq 8$ ) contra *Bordetella bronchiseptica* antes de la vacunación (Día 0). Todos los animales también estaban libres de *B. bronchiseptica*, según lo determinado por una prueba de aislamiento de hisopos nasales bacterianos antes de la vacunación (Día 0). Todos los perros también fueron negativos para anticuerpos contra CRCoV según lo determinado por el ensayo de anticuerpos inmunofluorescentes (IFA) a título de IFA  $<40$ , así como también determinado por neutralización sérica (título de SN  $\leq 11$ ) antes de la vacunación en el día 0. Todos los perros se confirmaron libres de CRCoV por aislamiento del virus de torunda nasal antes de la vacunación en el día 0.

**Tabla 3. Diseño del estudio**

Grupo	IVP/CP1	N	Vacunación			Desafío		
			Volumen (ml)	Días del estudio	Ruta	Días del estudio	Dosis diana/Perro	
							CRCoV	<i>Bordetella</i>
T01	Solución salina	10	1,0	0, 21	SC <sup>2</sup>	42,45	10 <sup>6</sup>	10 <sup>3</sup>
T02	Vacuna CRCoV	10						
T03	Solución salina	10						
T04	Vacuna CRCoV	9					10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>
T05	Solución salina	10					10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>
T06	Vacuna CRCoV	10						
1- Producto veterinario en investigación (IVP) o producto de control (CP) - denominados en conjunto IVP.								
2- Por vía subcutánea								

30 El aislado CRCoV, designado Max, se usó como material de desafío en este estudio. El stock de virus se produjo en el primer pase en la línea celular HRT-18G con un título de  $10^{7.1}$  TCID<sub>50</sub>/ml. La cepa de gato Bihir *Bordetella bronchiseptica* también se usó como material de desafío en este estudio.

35 Se observó la salud general de los animales una vez al día, desde la llegada hasta el desafío (días -7 a 42). En los días de vacunación (días 0 y 21), los animales se observaron dos veces (antes y después de la vacunación). Se recogieron muestras de sangre para serología de todos los animales en estudio los días 0 y 21 (antes de la vacunación), el día 42 (antes del desafío) y el día 65. Se recogieron tres tipos de hisopos nasales de cada perro.

- Los hisopos nasales se recolectaron en tubos de medio de transporte de virus (VTM) para el aislamiento del virus CRCoV el día 0, antes de la vacunación, el día 42, antes del desafío, y una vez al día de los días 43 a 52. Los hisopos nasales se recogieron en tubos que contenían caldo de triptosa fosfato (TPB) para el aislamiento de *Bordetella*. Los hisopos se recolectaron el día 0 antes de la vacunación, el día 45 antes del desafío y dos veces por semana durante 3 semanas después del desafío, y el día 65. Los hisopos nasales se recolectaron en medio Amies sin carbón, para el examen bacteriológico antes del desafío el día 42. Las temperaturas timpánicas se recogieron a partir del día -1; antes y 3-6 horas después de la vacunación en los días 0 y 21, días 1 a 7 y días 22 a 28. Se recogieron temperaturas timpánicas una vez al día de los días 40 a 65. En los días de desafío (días 42 y 45), dos colecciones se hicieron, antes del desafío y 3-6 horas después del desafío.
- Los animales se palparon en la región del hombro apropiada en los días 0 y 21 antes de la vacunación, para asegurar que no hubiera lesiones preexistentes en las áreas del sitio de inyección. Los animales recibieron la vacuna apropiada en los días 0 y 21, de acuerdo con el diseño del estudio que se muestra en la tabla 3. Las vacunas se administraron por vía subcutánea a cada perro en la región del hombro derecho para la primera vacunación, y en la región del hombro izquierdo para la segunda vacunación. La potencia de la vacuna de CRCoV se determinó mediante la prueba ELISA antes de la vacunación. Se observó a los animales aproximadamente 5 horas después de la vacunación en los días 0 y 21, y una vez al día en los días 1 a 7 y 22 a 28. En el día 42, las reservas de virus de desafío CRCoV se descongelaron y se diluyeron adecuadamente para preparar una suspensión viral para entregar una dosis diana de desafío de  $1 \times 10^6$  por perro. Los materiales de desafío se mantuvieron en hielo hasta la inoculación de desafío. El día 45, se usó cepa stock de gato Bihir *B. bronchiseptica* para preparar el material de desafío. En la etapa final de la preparación de la suspensión de desafío, la concentración del organismo se ajustó para proporcionar una dosis diana de desafío de  $10^3$  CFU por perro (T01/T02),  $10^5$  CFU por perro (T03/T04) y  $10^7$  CFU por perro (T05/T06) Los materiales de desafío se mantuvieron en hielo hasta la inoculación de desafío.
- En el día 42, a los perros de todos los grupos de tratamiento se les administró el virus mediante tratamiento por aerosoles en una cámara de plexiglás. En el día 45, los perros de los grupos de tratamiento apropiados fueron desafiados con el nivel asignado de *B. bronchiseptica*, mediante tratamiento por aerosoles en una cámara de plexiglás. Para el grupo de desafío T04, un animal fue retirado del estudio antes del desafío.
- Se observaron animales dos veces al día (a.m. y p.m.), durante aproximadamente 30 minutos cada sesión, en los días 40, 41 y 42, antes del desafío, para detectar signos clínicos de enfermedad respiratoria. Las observaciones clínicas se realizaron dos veces al día (a.m. y p.m.), aproximadamente 30 minutos cada sesión, desde el día 42 y hasta el día 64. En los días 42 y 45, las observaciones ocurrieron antes del desafío, y 3-6 horas después de la administración del desafío. El día 65, solo se realizó una observación (a.m.). La necropsia se realizó en todos los animales el día 65 como parte de la evaluación del estudio. En la necropsia, se extirpó asépticamente un pulmón completo y se colocó sobre un paño estéril. Los lóbulos pulmonares se evaluaron ampliamente y se evaluó una estimación del porcentaje de volumen de pulmón afectado. La evaluación del tejido fue realizada por un patólogo certificado por la Junta de ACVP. Para determinar el porcentaje de volumen del pulmón afectado, cada lóbulo pulmonar se calificó por el porcentaje de tejido afectado por cambios graves, que pueden incluir, pero no se limitan a, decoloración (cambio de color), falla al colapsar o cambio de textura (firme/consolidado, elástico/gomoso, duro o crepitación). Se estimaron los porcentajes de implicación por lesiones discretas o difusas. Se cortó la tráquea y se evaluó la luz en busca de patología macroscópica. Se recogieron dos tipos de muestras de tejido (secciones) de la tráquea y la cavidad nasal: una para el aislamiento del virus, y otra sección para la histopatología. El lóbulo craneal derecho del pulmón se dividió en dos secciones, una para el aislamiento del virus y otra para una muestra de bacteriología. Todo el lóbulo medio izquierdo del pulmón se cortó asépticamente en el plexo bronquial y se recogió para histopatología. Después de que todas las otras muestras (aislamiento de virus y bacteriología) se hayan recogido; el lóbulo se infló con aproximadamente 20-30 ml de formalina tamponada al 10% antes de colocarlo en un recipiente con formalina.
- Las muestras de suero fueron tituladas para anticuerpos específicos de CRCoV por IFA para cribado de animales, y por neutralización de suero (SN) para todas las demás muestras (días 0, 21, 42 y 65), según procedimientos estándar.
- Las muestras de suero de cribado se titularon para anticuerpos CRCoV por IFA. En resumen, las células HRT-18G se sembraron en placas de 96 pocillos y se infectaron con una cantidad óptima de CRCoV para obtener entre 50-200 células infectadas por pocillo. Las placas infectadas se fijaron con un fijador a base de acetona, se enjuagaron y se almacenaron. Las muestras de suero de prueba se diluyeron en serie 2 veces directamente en las placas fijadas con antígeno, y se incubaron durante 40-60 minutos. Se desechó el suero de prueba, se enjuagaron las placas y se agregó conjugado con IgG FA anti-canino de conejo y se incubó durante 40-60 minutos. Luego se enjuagaron los pocillos y se examinaron las placas para detectar fluorescencia bajo el microscopio. El título de anticuerpos se determinó como el recíproco de la dilución de suero más alta que exhibe fluorescencia típica (+1) o más intensa.
- Se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizantes de suero CRCoV en células HRT-18G. En resumen, se sembraron células HRT-18G en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a la densidad apropiada y se

incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 36 °C ± 1 durante 3-5 días. Cuando las monocapas celulares en los pocillos eran 100% confluentes, los pocillos se enjuagaron con medio y se pretrataron con medio suplementado con tripsina durante al menos 1 hora en la incubadora. Se prepararon diluciones dobles de cada suero de prueba y se incubaron con 50-422 TCID<sub>50</sub> CRCoV durante 40-60 minutos a temperatura ambiente. Las mezclas de suero y virus de cada dilución de suero se inocularon en dos pocillos. Las placas se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> humidificada (3-5% de CO<sub>2</sub>) a 35-37 °C, durante 5-7 días. Cuando se completó la incubación, las placas se fijaron, se tiñeron con anticuerpo conjugado CRCoV específico-FITC y se examinaron bajo un microscopio de epifluorescencia. El título de anticuerpos neutralizantes en suero se determinó como el recíproco de la mayor dilución en suero que neutralizó el virus en el 50% de los pocillos. Los anticuerpos aglutinantes contra *B. bronchiseptica* se determinaron mediante la prueba de aglutinación (Micro) de antígeno particulado (MAT), de acuerdo con el procedimiento estándar. En resumen, se realizaron diluciones en serie dos veces de suero de prueba, suero positivo conocido y suero negativo en placas de microtitulación de fondo en V, usando solución salina normal que contenía Tween 20 al 0,05% como diluyente. Se agregaron muestras de suero a 50 µl por pocillo. Se agregó un volumen de 50 µl de antígeno *B. bronchiseptica* a cada pocillo, y se mezcló durante 60 segundos en un mezclador de placa de microtitulación. Las placas se incubaron a 37 ± 2 °C, durante 2 horas, y luego las placas se almacenaron durante 20-48 horas a 2-8 °C. Las placas fueron leídas visualmente en un soporte de espejo. El título se expresa como el recíproco de la dilución más alta que muestra aglutinación completa. Los hisopos nasales y los tejidos se analizaron para detectar la presencia de CRCoV en células HRT-18G. En resumen, las muestras se procesaron y se inocularon en matraces sembrados con células HRT-18G. Las muestras nasales se inocularon en matraces T-25. Se inocularon muestras de lavado de tejido y pulmón en matraces T-150. Los matraces inoculados se incubaron durante la noche en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 36 °C ± 1. Luego, se agregó suero fetal bovino (FBS) a cada matriz (80 µl por matriz T-25 o 500 µl por matriz T-150). Los matraces se incubaron durante aproximadamente 7 días en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 36 °C ± 1. Luego se tomaron muestras y se inocularon en células HRT en placas de 96 pocillos. Se inocularon cuatro pocillos de la placa con 120 µl/pocillo, y se inocularon 4 pocillos adicionales con 30 µl/pocillo. Las placas de 96 pocillos se incubaron durante 5 a 7 días en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 36 °C ± 1, se fijaron con un fijador a base de acetona y luego se tiñeron con tinción CRCoV FA (todos los pocillos). La presencia de virus en la muestra se declaró cuando se observó fluorescencia típica (células positivas CRCoV FA) bajo el microscopio.

El título del material de desafío se determinó en HRT-18G. En resumen, las células HRT-18G se sembraron en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos a la densidad apropiada, y se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 36 °C ± 1, durante 1-3 días. Cuando la monocapa celular era 100% confluyente, los pocillos se enjuagaron con medio y se trataron previamente con medio suplementado con tripsina durante 1 hora en la incubadora de CO<sub>2</sub>. La prueba diluida en serie diez veces se inoculó en los pocillos, en 6 repeticiones por dilución. Las placas se incubaron en una incubadora de CO<sub>2</sub> humidificado (3-5% de CO<sub>2</sub>) durante 5-7 días a 35-37 °C. Después de la incubación, el medio se descartó, y las células se incubaron durante 20-40 minutos con un fijador en base a acetona a temperatura ambiente. El fijador se descartó y las placas se enjuagaron dos veces con agua. El anticuerpo conjugado con CRCoV FITC se agregó a los pocillos y se incubó durante 40-60 minutos a temperatura ambiente. Cuando se completó la incubación, los pocillos se enjuagaron dos veces con agua antes de observar las placas con un microscopio de epifluorescencia para detectar la presencia de células infectadas con CRCoV. El punto final del 50% para la infectividad se calculó usando el método Spearman-Kärber, y el título del virus se expresó como log<sub>10</sub> TCID<sub>50</sub>/ml.

El aislamiento de *Bordetella bronchiseptica* de los hisopos nasales se realizó de acuerdo con procedimientos estándar. Cada muestra se probó cualitativamente (presencia o ausencia) para *B. bronchiseptica*. Los hisopos nasales y las muestras de tejido pulmonar se evaluaron para determinar la presencia de *B. bronchiseptica*, *Mycoplasma sp.*, *Streptococcus canis*, *Staphylococcus intermedius* y *Pasteurella sp.* de acuerdo con los procedimientos estándar. Se prepararon portaobjetos para tejidos de cavidad nasal, pulmón y traqueal, y un patólogo certificado por el ACVP las evaluó para detectar lesiones histopatológicas.

Se calculó para cada animal el porcentaje de períodos de observación después del desafío que un animal tose y tuvo secreción nasal, así como la duración de los días posteriores al desafío con tos y secreción nasal. El porcentaje transformado de la raíz cuadrada de Arcsine de los períodos de observación y la duración se analizaron con un modelo mixto lineal general por separado para cada dosis de desafío (T01 frente a T02, T03 frente a T04 y T05 frente a T06). El efecto fijo en el modelo fue el tratamiento, y los efectos aleatorios fueron bloques y residuales. Además de las medias de mínimos cuadrados, los errores estándar y los límites de confianza del 90%, se calcularon los mínimos y máximos de tratamiento. Los medios mínimos cuadrados, los errores estándar y los límites de confianza se transformaron de nuevo según corresponda. Las distribuciones de frecuencia de la presencia o ausencia de aislamiento del virus CRCoV de los hisopos nasales se calcularon para cada grupo de tratamiento y punto de tiempo. Se calculó el número de días que un animal detectó el virus CRCoV en los hisopos nasales después del desafío (primer día detectado hasta el último día detectado) para cada animal. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de la presencia/ausencia de aislamiento del virus a partir de datos de tejido para cada grupo de tratamiento. Las distribuciones de frecuencia del aislamiento de *B. bronchiseptica* de los hisopos se calcularon para cada tratamiento. Se calcularon las distribuciones de frecuencia del aislamiento de *B. bronchiseptica* de los hisopos nasales para cada tratamiento y punto de tiempo. Se calculó para cada animal el número de días que un animal tiene bacterias detectadas en los hisopos nasales después

del desafío (primer día detectado hasta el último día detectado). Se calcularon estadísticas descriptivas del número de días, incluyendo la media, la desviación estándar, el mínimo y el máximo para cada tratamiento. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de las observaciones clínicas (estornudos, secreción ocular, arcadas, depresión y respiración) para cada punto de tiempo y tratamiento. Los animales se clasificaron con fiebre ( $\geq 39,5$  °C) o sin fiebre ( $< 39,5$  °C) cada día. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de fiebre/sin fiebre para cada tratamiento y punto de tiempo.

La implicación pulmonar difusa, discreta y total se calculó con la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de implicación} = 0,53 [(0,35 \times \text{lóbulo craneal derecho}) + (0,15 \times \text{lóbulo medio derecho}) + (0,40 \times \text{lóbulo caudal derecho}) + 0,10 \times \text{lóbulo accesorio}] + 0,47 [(0,30 \times \text{lóbulo craneal izquierdo}) + (0,25 \times \text{lóbulo medio izquierdo}) + (0,45 \times \text{lóbulo caudal izquierdo})]$$

La implicación del porcentaje de transformada de raíz cuadrada de Arcsine se analizó con un modelo mixto lineal general por separado para cada dosis de desafío (T01 frente a T02, T03 frente a T04 y T05 frente a T06). El efecto fijo en el modelo fue el tratamiento, y los efectos aleatorios fueron bloqueos y residuales. Además de los medios mínimos cuadrados, los errores estándar y los límites de confianza del 90%, también se calcularon los mínimos y máximos del tratamiento. Los medios mínimos cuadrados, los errores estándar y los límites de confianza se transformaron de nuevo. Las distribuciones de frecuencia de la presencia de lesiones macroscópicas, decoloración y aumento de las secreciones se calcularon para cada grupo de tratamiento. Se calcularon las distribuciones de frecuencia de las observaciones del sitio de inyección (hinchazón y dolor) para cada punto de tiempo y tratamiento. Las estadísticas descriptivas, que incluyen la media geométrica, el mínimo y el máximo de los títulos de anticuerpos, se calcularán para cada grupo de tratamiento y punto de tiempo.

**Resultados.** No hubo dolor ni fiebre ( $\geq 39,5$  °C) en ninguno de los perros después de la vacunación. Se informó que la mayoría de los vacunados (T02, T04, T06) tenían rascaduras en el momento de la vacunación. Se informaron inflamaciones por inyección en la mayoría de los vacunados, pero estas inflamaciones se resolvieron para la mayoría de los perros en 3 días o menos. Se informaron tres perros con reacciones de hipersensibilidad durante las 3-6 horas después de la 2ª observación de vacunación. Dos de los perros fueron tratados con difenhidramina para revertir los síntomas.

La vacuna CRCoV indujo respuestas de anticuerpos neutralizantes del suero en los perros vacunados después de la primera dosis, lo que indica inmunización activa. La respuesta geométrica de neutralización sérica media (SN) aumentó después de la segunda vacunación a un GMT  $\geq 955$  en los grupos vacunados (T02, T04, T06) en comparación con  $< 4$  en los grupos de control de solución salina (T01, T03, T04), lo que indica un efecto de refuerzo de la vacuna. Se logró una respuesta SN anamnésica robusta (GMT  $\geq 11146$ ) en los vacunados en comparación con los controles de solución salina (GMT  $\leq 446$ ) después del desafío (Día 65), lo que indica una respuesta eficaz de la memoria inmune.

La eficacia de la vacuna CRCoV se evaluó frente a una titulación de dosis de desafío doble. El nivel de dosis de desafío con CRCoV (confirmado en  $10^{5.5} \text{TCID}_{50}/\text{perro}$ ) se mantuvo constante, mientras que la dosis de desafío de *B. bronchiseptica* se administró en un objetivo bajo de  $10^3$  CFU por perro (confirmado en  $5,4 \times 10^3$ ) para los grupos T01 y T02, una diana media  $10^5$  (confirmado en  $4,2 \times 10^5$ ) para los grupos T03 y T04, y un objetivo alto  $10^7$  (confirmado  $4,3 \times 10^7$ ) para los grupos T05 y T06, para asegurar la inducción de una enfermedad clínica óptima. Los datos de aislamiento de organismos CRCoV y *Bordetella* después del desafío indicaron que la infección se logró en perros inoculados a los tres niveles de dosis. Sin embargo, en base al nivel de enfermedad clínica inducida en los perros, como se discute a continuación, se determinó la dosis de desafío de *Bordetella* más baja como la dosis óptima para evaluar la eficacia de la vacuna. Los perros de control de solución salina (T01, T03 y T05) mostraron una amplia gama de signos clínicos respiratorios, incluyendo la tos. Los vacunados (T02) tuvieron una reducción significativa en la duración y los períodos porcentuales con tos (valores p 0,0470 y 0,0033, respectivamente), en comparación con los controles (T01) en el grupo de desafío de dosis baja. Los medios mínimos cuadrados (LS) para la duración y los medios LS transformados de nuevo para el período porcentual con tos en el grupo control (T01) fueron 10,8 y 14,7, en comparación con 5,3 y 2,4 en los vacunados (T02), respectivamente. La reducción de la tos disminuye entre los vacunados y los controles a medida que aumenta la dosis de desafío, probablemente debido al exceso de desafío. Los datos sobre la tos indican claramente que la vacuna CRCoV fue capaz de inducir inmunidad suficiente para reducir la tos inducida por el desafío doble en el grupo de dosis de desafío óptimo. Los datos de secreción nasal mostraron que los vacunados (T02) habían reducido significativamente el período porcentual con secreción nasal (media 4,6) en comparación con los controles (media 17,4), con un valor de p 0,0299 en el grupo de dosis baja. Como se discutió para la tos, la reducción de la secreción nasal entre los vacunados y los controles disminuye a medida que se alcanza una dosis de sobre desafío. Los datos de secreción nasal indican claramente la eficacia de la vacuna contra la secreción nasal en el grupo de dosis de desafío óptimo. Se informó que un total de 5 perros tenían temperaturas de  $\geq 39,5$  °C, durante un día cada uno durante el período después del desafío: cuatro de los grupos de control de solución salina, y uno de un grupo de vacunación (T02; Día 44). Si bien los datos muestran menos animales con fiebre en los vacunados en comparación con los controles en la dosis baja, la fiebre no se

conoce como un criterio consistente para CRCoV, *Bordetella* o el desafío doble. Por lo tanto, no se usó para juzgar la eficacia de la vacuna.

5 La evaluación de la necropsia macroscópica de los órganos respiratorios fue realizada por un patólogo certificado por la Junta de ACVP en el día 65. El examen reveló que el principal hallazgo de la necropsia fue la consolidación pulmonar. Esto es consistente con los hallazgos anteriores del estudio de doble desafío. Por lo tanto, la consolidación pulmonar se usó como criterio para juzgar la eficacia de la vacuna. Se observó una reducción significativa de la consolidación pulmonar discreta (porcentaje medio de 0,9 frente a 4,02) y total (porcentaje medio de 1,44 frente a 7,7) en los vacunados, en comparación con los controles en el grupo de dosis baja, valores de p 0,0457 y 0,093, respectivamente. De acuerdo con los signos clínicos, la reducción efectuada por la vacuna disminuye a medida que aumenta la dosis de desafío y se alcanza un sobre desafío. Es importante tener en cuenta que no hubo implicación de otros patógenos respiratorios en los tejidos pulmonares, como lo confirman los resultados del examen bacteriológico, esto es, las lesiones pulmonares informadas fueron específicamente los resultados del desafío doble. Los datos sugieren que una infección previa con el virus predispone a los perros al afectar sus defensas inmunes innatas, lo que lleva a una infección bacteriana más invasiva. Un patrón típico de infección por virus y bacterias que ocurre con frecuencia en el campo que conduce al desarrollo de neumonía en perros en el complejo de enfermedades respiratorias caninas (CIRD), o en bovinos en el complejo de enfermedades respiratorias bovinas (BRDC), y posiblemente también en otras especies animales. Los datos obtenidos en este estudio indican que la vacuna fue capaz de proteger a los perros al reducir la aparición de bronconeumonía causada por el desafío doble en perros vacunados, en comparación con los controles a la dosis de desafío óptima.

Basado en análisis patológicos macroscópicos y microscópicos, la vacunación con CRCoV protegió claramente los perros al reducir la incidencia y la gravedad de la bronconeumonía causada por el desafío intranasal doble controlada con  $10^3$  CFU de *B. bronchiseptica* y  $10^6$  TCID<sub>50</sub> de CRCoV. El efecto protector se reduce cuando la dosis de desafío con *B. bronchiseptica* aumenta a  $10^5$  CFU o más, quizás debido a la abrumadora respuesta inmune innata y adaptativa. Además, los hallazgos patológicos se correlacionaron bien con la reducción de los signos clínicos respiratorios informados en los perros vacunados.

No hubo virus aislado de los tejidos en el día 65 (23 días después del desafío con CRCoV) como se esperaba, debido a la naturaleza de aparición y desaparición rápida de la infección viral. La vacuna protegió a los perros al reducir la duración del desprendimiento nasal en los vacunados (T02) en comparación con los controles de solución salina (T01), lo que indica la capacidad de la vacuna para reducir la infección en el grupo de dosis de desafío óptimo.

En resumen, los datos de signos clínicos (tos, secreción nasal) y lesiones pulmonares (consolidación, histopatología) obtenidos de este estudio demuestran inequívocamente la protección proporcionada por la vacuna monovalente CRCoV contra un desafío dual con CRCoV-*B. bronchiseptica*. Estos datos colectivamente indican que la vacuna CRCoV monovalente fue capaz de inducir inmunidad protectora en los perros vacunados que resultó en la reducción de la enfermedad respiratoria (tos, secreción nasal) y neumonía (consolidación pulmonar) causada por un desafío dual con CRCoV-*B. bronchiseptica*. Por lo tanto, los datos proporcionan pruebas de la utilidad de una vacuna CRCoV para reducir la enfermedad respiratoria en perros después de una infección inicial por CRCoV y la posterior infección bacteriana.

40

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición que comprende coronavirus respiratorio canino (CRCoV) para su uso como vacuna para la prevención de una enfermedad bacteriana en un perro, en la que la enfermedad bacteriana es causada por *Bordetella bronchiseptica*.
- 5 2. La composición para el uso de la reivindicación 1, en la que la composición comprende además un portador, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable.
3. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición comprende además uno o más inmunógenos adicionales.
- 10 4. La composición para el uso de la reivindicación 3, en la que el uno o más inmunógenos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en virus de parainfluenza canina (CPIV), adenovirus-2 canino (CAV-2) y virus de gripe canina (CIV).
- 15 5. La composición para el uso de la reivindicación 3, en la que el uno o más inmunógenos adicionales se seleccionan del grupo que consiste en virus del moquillo canino (CDV), parvovirus canino (CPV), coronavirus canino entérico (CCV), adenovirus canino, *Leptospira* serovars, en particular, *Leptospira canicola*, *Leptospira grippotyphosa*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, *Leptospira pomona*, y *Leptospira Bratislava*, virus del herpes canino, pneumovirus canino, organismos *Leishmania*, una especie *Borrelia* (spp.), especie *Mycoplasma*, rabia, *Ehrlichia canis*, *Bordetella bronchiseptica* y cualquier combinación de los mismos.
- 20 6. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición consiste esencialmente en CRCoV y no en inmunógenos adicionales.
7. La composición para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la composición tiene una duración de eficacia contra la enfermedad bacteriana durante un período de al menos 6 meses.
8. Una composición que comprende coronavirus respiratorio canino (CRCoV) para su uso como vacuna para la prevención de la enfermedad respiratoria canina en un perro causado por infecciones bacterianas, en la que la infección bacteriana es de *Bordetella bronchiseptica*.
- 25 9. Coronavirus respiratorio canino (CRCoV) para su uso como vacuna para la prevención de una enfermedad respiratoria canina multifactorial en un perro causada por infecciones por virus y bacterias mixtas mediante la administración del coronavirus respiratorio canino (CRCoV) al perro, en el que se produce la infección bacteriana por *Bordetella bronchiseptica*.
- 30 10. Coronavirus respiratorio canino (CRCoV) para su uso en un procedimiento para aumentar la inmunogenicidad de una composición de vacuna para la prevención de infecciones bacterianas en un perro, en la que la vacuna comprende un antígeno bacteriano que es *Bordetella bronchiseptica*, y en la que el procedimiento comprende la coadministración el coronavirus respiratorio canino (CRCoV) al perro.