



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 353 208**

51 Int. Cl.:

A61K 35/14 (2006.01)

A61K 35/26 (2006.01)

A61K 35/28 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03707241 .0**

96 Fecha de presentación : **26.02.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1522307**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.04.2005**

54 Título: **Extracto dializado de leucocitos para el tratamiento de enfermedades infecciosas en animales.**

30 Prioridad: **28.02.2002 MX 0202171**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.02.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.02.2011

73 Titular/es: **Luis Antonio Calzada Nova**
Calle 6 No. 18, Colonia Espartaco
04870 Mexico D.F., MX

72 Inventor/es: **Calzada Nova, Luis Antonio**

74 Agente: **Durán Moya, Luis Alfonso**

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

Extracto dializado de leucocitos para el tratamiento de enfermedades infecciosas en animales.

5 **Sector de la invención**

La presente invención se refiere al sector del tratamiento de enfermedades infecciosas mediante la transferencia y estimulación de inmunidad mediada por células a través de extractos de leucocitos dializados, así como métodos de obtención y preservación del extracto.

10 **Antecedentes de la invención**

Las enfermedades siempre han sido parte de la experiencia de la vida humana y animal. Desde el establecimiento de las bases para la prevención y tratamiento de las infecciones se han implementado terapias eficaces contra la mayoría de las enfermedades.

A pesar de todos los adelantos en el tratamiento de enfermedades en animales, no existían, hasta antes de la presente invención, tratamientos terapéuticos efectivos contra ciertos tipos, tales como aquellos en los que el pronóstico es poco favorable para el animal después de que aparecen los signos típicos de la enfermedad, con lo cual el paciente tiene pocas probabilidades de sobrevivir. En estos casos, el tratamiento se había limitado a tratar de conservar al animal en el mejor estado fisiológico posible a fin de permitir que su propio sistema inmunológico fuese capaz de responder. Ejemplos de estas enfermedades son la enfermedad de Aujeszky y el moquillo canino.¹

El moquillo canino representa hasta el día de hoy, una de las enfermedades domésticas más importantes a nivel doméstico y de diseminación mundial.

El moquillo canino es una enfermedad sistémica, infecciosa, altamente contagiosa e inmunosupresora, de evolución aguda o subaguda, con signos clínicos respiratorios, gastrointestinales y neurológicos. Esta dolencia tiene un alto índice de mortalidad que afecta a perros y otros carnívoros en todo el mundo y se transmite por un agente viral. Es la enfermedad viral más prevaleciente en los perros y se considera que hay pocos en el mundo que viven en zonas aisladas y que no han sido expuestos o infectados con el virus.

El contagio se produce principalmente al propagarse el virus por el aire o por el contacto directo con perros infectados, replicándose así en los tejidos linfoides sistémicos, provocando fiebre, viremia y la diseminación a los tejidos epiteliales y al sistema nervioso central; la evolución depende de la cantidad del inóculo, la cepa viral y la respuesta inmunológica del huésped. La enfermedad presenta signos multisistémicos, fiebre y un alto porcentaje de mortalidad; una vez que los signos clínicos característicos del moquillo canino se hacen evidentes, el pronóstico es extremadamente pobre, la mayoría de ellos progresan de manera desfavorable, independientemente del tratamiento y de los periodos de mejoría aparente; como consecuencia, los animales mueren con o sin signos neurológicos.

El moquillo canino es la enfermedad infectocontagiosa con los mayores índices de morbilidad en los perros, la cual oscila entre el 25 y el 50%. La mortalidad es tan alta como del 50 al 100% de los casos dependiendo de la cepa viral, el tipo de población canina afectada, la edad de los perros, el estado de inmunización poblacional y la respuesta inmunológica de los animales. La rabia es la única enfermedad que tiene un índice de mortalidad mayor al del moquillo canino, ya que éste es siempre del 100%.

Antes de la presente invención, no existía un tratamiento específico para esta enfermedad. El tratamiento consistía únicamente en la administración de fármacos quimioterapéuticos, de tal manera que el tratamiento se limitaba a la restauración de medidas sintomáticas y la eutanasia una vez que se observaban signos neurológicos. Durante la evolución de la enfermedad, es posible que ocurra la recuperación espontánea de algunos perros con moquillo sistémico no nervioso, con la aplicación de medidas terapéuticas sintomáticas, lo que puede otorgar créditos inapropiados a determinados regímenes terapéuticos.^{2,3,4,5,6,7}

Al igual que en el moquillo canino, en diversas enfermedades infecto-contagiosas, se observa una afectación importante en la respuesta del sistema inmunológico, lo que permite una evolución mayor de la enfermedad.

Dentro de los factores que pueden causar o favorecer la inmunodeficiencia en los animales, están la desnutrición grave, la quimioterapia citotóxica, la superpoblación así como cualquier otra causa que provoque estrés intenso o prolongado, por citar algunas. La inmunosupresión genera varios efectos, tales como una mayor frecuencia de infecciones de tipo severo, parasitosis, infecciones bacterianas o virales persistentes o recurrentes, poca o ninguna respuesta al tratamiento adecuado y la infección por microorganismos no patógenos. Se han realizado estudios exhaustivos en relación al funcionamiento del sistema inmune en animales y el papel que éste juega en los organismos para combatir las infecciones. Entre las diversas líneas de investigación que se han estudiado en este sentido, está el estudio de la transferencia de inmunidad de un organismo a otro a través de diversas estrategias, que involucran principalmente fluidos o células del sistema inmunológico.

Landsteiner y Chase describieron la transferencia de inmunidad que podría realizarse a través de células de cobayas sensibilizadas donantes a cobayas receptoras no sensibilizadas, al inducir alergias por contacto al cloruro de picrilo

inyectando células de exudado peritoneal de los animales sensibilizados en la piel de los animales receptores. Más tarde demostraron que la inyección intradérmica de leucocitos aislados de exudado peritoneal inducido en cobayas sensibilizadas a la tuberculina puede producir hipersensibilidad cutánea específica “retardada” a la tuberculina en cobayas no sensibilizadas. En ese mismo trabajo se intentó realizar la transferencia de esta reactividad utilizando suero y células muertas, sin buenos resultados. Posteriormente se determinó que bajo ciertas condiciones era posible transferir la hipersensibilidad por contacto de cobayas sensibilizadas con antígenos del veneno de hiedra venenosa a cobayas receptoras no sensibilizadas, mediante la inyección de células linfoides muertas. Asimismo en experimentos posteriores se lograron resultados semejantes en la transferencia de inmunidad celular mediante la utilización de clorodinitrobenzenceno como antígeno y extractos leucocitarios como vehículo de transferencia.

Lawrence revela que la inyección intradérmica de leucocitos viables obtenidos de donantes humanos positivos a la intradermorreacción con tuberculina en personas negativas al citado antígeno, puede inducir hipersensibilidad cutánea pasiva; también menciona que la hipersensibilidad cutánea transferida es transitoria con una duración de cuatro días a tres meses.⁸ Posteriormente confirma que el grado de duración del estado sensitivo transferido guarda una relación con el grado de sensibilización del leucocito donante y la cantidad de leucocitos utilizados; asimismo, que la sensibilidad retardada inducida tras la inyección de lisados de leucocitos es similar a la observada con la inyección de leucocitos viables.⁹ Hasta ese momento el significado de la transferencia de la hipersensibilidad cutánea era desconocido y, en consecuencia, estos trabajos recibieron poca atención. Los resultados obtenidos por Lawrence, relacionados con el extracto dializado de leucocitos (EDL) fueron vistos con escepticismo por algunos inmunólogos y se propusieron explicaciones alternativas. Una se basó en el punto de que Lawrence en sus experimentos siempre utilizaba antígenos de agentes infecciosos o componentes de vacunas comunes y que el organismo receptor reaccionaba por sensibilización primaria; también se propuso que los contenidos de receptores en los extractos dializados de leucocitos ya estaban sensibilizados a los antígenos y el extracto dializado actuaba como refuerzo o amplificador de las sensibilidades preexistentes. En experimentos posteriores con antígenos sintéticos y estudios controlados realizados con ratones fue posible rechazar estas posibilidades. También se postuló que el dializado contenía fragmentos de antígenos altamente inmunogénicos y que el extracto dializado de leucocitos producía sus efectos por sensibilización activa de los receptores, teoría que a la fecha ha sido desechada.

En la década de los 70 resurge el interés por el EDL y los factores de transferencia contenidos en él, cuando se observó que su aplicación en personas con determinados síndromes de inmunodeficiencia de origen genético, tales como el síndrome Wiskott-Aldrich, mejoraba los parámetros clínicos e inmunológicos. Con ello se inició la investigación clínica con la aplicación del extracto dializado de leucocitos.¹⁰

En el área clínica de la medicina humana se ha descrito la utilización del EDL para el tratamiento de diversas enfermedades, tales como las infecciones por virus herpes simplex, viruela¹¹, sarampión, afecciones dermatológicas del tipo de melasma, acné, condilomatosis y papilomatosis.¹² También ha mostrado eficacia contra las infecciones por *Candida albicans*,¹³ *Varicella zoster*,¹⁴ *Cryptosporidium spp.*,^{15,16} *Mycobacterium tuberculosis*¹⁷ y *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

En animales se ha descrito la transferencia de hipersensibilidad retardada en diversas enfermedades. Para el caso de cerdos en colibacilosis, enfermedad de Aujeszky, cólera porcino y gastroenteritis transmisible; en bovinos en rinotraqueitis infecciosa, salmonelosis y paratuberculosis; en pollos en enfermedad de Newcastle, laringotraqueitis infecciosa, enfermedad de Marek y coccidiosis; y en conejos en catarro infeccioso.

Sin embargo, en múltiples estudios realizados en animales y seres humanos para fines terapéuticos utilizando el extracto dializado, se ha observado una gran heterogeneidad en los resultados obtenidos, dado que no se reportan tratamientos que funcionen de manera consistente en un alto porcentaje de los pacientes y en los cuales se observe una recuperación total del estado de salud; tal es el caso de infecciones ocasionadas por *Candida albicans*,^{18,19} *Leishmania* y *Salmonella*.²⁰ En algunos casos, la aplicación del extracto a enfermos con infecciones crónicas o recurrentes se ha realizado como un último esfuerzo en pacientes en los cuales los tratamientos han fracasado sin obtener resultados positivos en su recuperación, observándose incluso la muerte.²¹

Según lo reportado hasta la actualidad, el éxito de tales terapias depende de múltiples factores, desde el estado de salud del paciente (incluyendo la fase de evolución de la enfermedad), la enfermedad en sí, e incluso la fuente de la cual se obtuvo el extracto de leucocitos;²² en este sentido, la previa sensibilización del donante de leucocitos a los antígenos específicos implicados en la enfermedad que será tratada en los pacientes, es un factor determinante para la observación de los efectos terapéuticos.^{23,24,34}

En relación al extracto de leucocitos, estudios posteriores permitieron determinar algunas de sus propiedades, las cuales ubicaban al extracto como dializable, termoestable, resistente a la congelación y al tratamiento con ADNasa, ARNasa o tripsina,²⁵ que contenía moléculas de un peso molecular menor a 10.000 Daltones,²⁶ adenina, guanina, citosina, uracilo y ribofosfato en material polinucleotídico^{27,28} y pequeños polipéptidos.

Posteriormente se determinó que el extracto contiene más de 200 moléculas diferentes con pesos moleculares de 1.000 a 12.000 Daltones y de las cuales se han podido identificar algunas (nicotinamida, serotonina, ascorbato, timosina, prostaglandinas, interleucina-8, factores de transferencia, hipoxantina y uracilo, entre otras). Asimismo, hasta el momento se han podido determinar y aislar algunas de estas moléculas así como fracciones del extracto y estudiar su papel en los efectos terapéuticos que se han observado derivados de su aplicación, tales como una fracción

denominada “inmunopéptido”²⁹ (responsable de la formación de rosetas de células T con eritrocitos de carnero), la fracción B consistente en doce aminoácidos y de tres a cuatro bases de ARN³⁰ (responsable del efecto de hipersensibilidad retardada a receptores no inmunes), la fracción Tx³¹ (capaz de transferir hipersensibilidad retardada a cobayas) y péptidos altamente polares, hidrofílicos y con una actividad biológica muy potente, como por ejemplo los péptidos LLYAQDLEDN y LLYAQDVEDN.³²

Por otro lado, se ha dado a conocer que el extracto dializado de leucocitos presenta una estabilidad mediana, conservándose únicamente sus efectos terapéuticos durante varios meses a temperaturas de -20°C a -70°C.³⁴ Estos métodos de conservación del extracto no son fáciles de controlar, aun en situaciones de administración a pacientes en el campo (en granjas o zonas rurales donde no existen aparatos de congelación a estas temperaturas) así como para su venta y distribución al público.

En estudios posteriores, se logró aumentar su estabilidad al almacenaje a 4°C mediante la adición al extracto de albúmina sérica bovina,³³ con lo cual se adicionan sustancias que pueden provocar efectos adversos al paciente (transmisión de enfermedades o incremento de respuestas inmunes al preservador) o hacer más susceptible de contaminación al extracto.

En cuanto a sus efectos terapéuticos, es conocido que el extracto dializado de leucocitos tiene muchos efectos sobre la inmunidad celular ya que contiene factores inductores y supresores obtenidos de células t-auxiliares y células t-supresoras respectivamente. Se ha argumentado que la variedad de actividades biológicas observadas, se debe a que el extracto contiene una mezcla heterogénea de moléculas, siendo cada una de ellas responsable de uno o varios efectos. Las respuestas y efectos observados en las aplicaciones clínicas del extracto han permitido ubicarlo como un inmunomodulador útil para la inmunoterapia e inmunoprolifaxis de enfermedades donde la inmunidad celular se encuentra deprimida de forma primaria o secundaria, así como en estados morbosos en los que la inmunidad se encuentra exacerbada, induciendo lesiones por autoinmunidad.

Se ha observado que el extracto dializado de leucocitos transfiere hipersensibilidad local y sistémica y no causa reacción incompatible aun entre diversas especies, transfiere rechazos de haloinjertos, ejerce una acción directa sobre la producción de interleucina 1, 8 y 12, produce un incremento de la activación de macrófagos, aumenta la síntesis de ADN antígeno dependiente de los linfocitos, resintetiza el receptor del factor de transferencia, promueve la quimiotaxis de monocitos y neutrófilos, aumenta la actividad de células asesinas naturales (NK), acelera la formación de rosetas de células T, induce la formación de poblaciones de linfocitos que reaccionan específicamente ante un antígeno, expande las poblaciones de linfocitos y la inmunidad celular, incrementa la producción de linfocinas y aumenta la citotoxicidad de células T contra antígenos tumorales específicos; asimismo no se descarta la posibilidad de que cause otros posibles efectos.³⁴

Hasta la fecha, no se conoce el mecanismo de acción del EDL por el cual puedan explicarse todos los efectos observados en sus aplicaciones clínicas.

40 Descripción detallada de la invención

La presente invención utiliza el EDL como el principio activo de un medicamento que permite tratar y prevenir diversas enfermedades infecciosas en animales, preferentemente aquellas enfermedades que afecten a caninos, equinos y porcinos, como por ejemplo perros, caballos y cerdos.

La presente invención se sustenta en los antecedentes documentales del EDL tanto en humanos como en animales, con la diferencia de que se utiliza con fines terapéuticos, jamás descritos en Medicina Veterinaria. Se prueba en una amplia gama de enfermedades de perros, caballos y cerdos, con dosis reducidas que optimizan su utilización, obtenido de diferentes tejidos y administrado por vía parenteral con EDL de origen tisular propio y diferente de la especie receptora. De acuerdo con lo que se ha descrito anteriormente, uno de los objetivos de la presente invención es dar a conocer un tratamiento en animales eficaz contra enfermedades infectocontagiosas con un elevado grado de morbilidad en fases avanzadas mediante la aplicación de un extracto de leucocitos dializado, dado que con anterioridad a la presente invención dicho tratamiento no existía. Un objetivo adicional de la presente invención es dar a conocer un tratamiento en animales eficaz contra enfermedades infectocontagiosas que deprime el sistema inmune mediante la administración de un extracto de leucocitos dializado.

Un objetivo adicional de la presente invención es dar a conocer un tratamiento para perros eficaz contra el moquillo canino con alto grado de morbilidad en fases avanzadas mediante la aplicación de EDL, ya que con anterioridad a la presente invención, no se conocían tratamientos eficaces que permitieran restablecer la salud de los perros después de la aparición de los signos clínicos de la enfermedad.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un método de obtención de EDL a partir de linfonodos, bazo y timo con rendimientos mayores a los métodos conocidos hasta la fecha.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un EDL estable a 4°C sin utilizar conservantes o preservantes, con los que se conservan sus propiedades terapéuticas, ya que con anterioridad a la presente invención no se habían obtenido extractos dializados de leucocitos estables a esta temperatura y sin la utilización de sustancias ajenas al extracto. Esto se logra a través de la esterilización del EDL por ozono.

Otro objetivo de la presente invención es dar a conocer un kit terapéutico que contiene EDL para el tratamiento de animales afectados por enfermedades altamente infectocontagiosas con alto grado de morbilidad en etapas avanzadas.

Los EDL del presente trabajo, pueden utilizarse para el tratamiento de enfermedades asociadas a inmunodepresión, tales como las siguientes, las cuales se muestran únicamente para ilustrar el espectro de aplicación de los extractos sin limitar su utilización a otras enfermedades o bien a otros animales:

- | | | |
|----|--------------|--|
| 10 | En bovinos: | Rinotraqueitis infecciosa bovina (α herpesvirus), mamilitis ulcerativa (α herpesvirus), fiebre catarral maligna (α herpesvirus), enfermedad de Aujeszky (α herpesvirus), fiebre catarral maligna (γ herpesvirus), peste bovina (morbilivirus), parainfluenza-3 (morbilivirus), virus sincitial bovino (pneumovirus), diarrea neonatal de la ternera (coronavirus), papilomatosis (papilomavirus), leucosis bovina (oncornavirus), septicemia hemorrágica (<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Pasteurella hemolytica</i>), pleuroneumonía contagiosa (<i>Mycoplasma mycoides</i>), mastitis bovina (<i>Mycoplasma alkalescens</i> , <i>M. canadense</i> , <i>M. bovis</i> , <i>M. laidlawii</i>), paratuberculosis, tuberculosis, actinomicosis, actinobacilosis, leptospirosis, coccidioidomicosis, coccidiosis, erliquiosis. |
| 20 | En equinos: | Rinoneumonitis equina (α herpesvirus, tipo I y IV), exantema coital equino (α herpesvirus, tipo-3), influenza equina (ortomixovirus), parainfluenza-3 (paramixovirus), anemia infecciosa equina (lentivirus), papilomatosis (papilomavirus), histoplasmosis, coccidiosis, erliquiosis, leptospirosis. |
| 25 | En caninos: | Moquillo canino (morbilivirus), parainfluenza SV-5 canina (paramixovirus), herpesvirus canino (α herpesvirus), enfermedad de Aujeszky (α herpesvirus), papilomatosis (papilomavirus), histoplasmosis, coccidioidomicosis, criptococosis, blastomicosis, criptococosis, aspergilosis, candidiasis, coccidiosis, toxoplasmosis, neosporosis, leishmaniasis, criptosporidiosis, balantidiasis, amibiasis, erliquiosis, leptospirosis, brucelosis. |
| 30 | En felinos: | Rinotraqueitis felina (α herpesvirus), urolitiasis felina (β herpesvirus), enfermedad de Aujeszky (α herpesvirus), peritonitis infecciosa felina (coronavirus), leucemia viral felina (oncovirus). |
| 35 | En porcinos: | Herpesvirus del cerdo lactante (α herpesvirus), rinitis atrófica (β herpesvirus, <i>Bordetella bronchiseptica</i> , <i>Hemophilus suis</i> , <i>Pasteurella multocida</i>), enfermedad de Aujeszky (α herpesvirus), influenza porcina (ortomixovirus), gastroenteritis transmisible (coronavirus), encefalomiелitis hemoaglutinante (coronavirus), enfermedad de ojo azul (paramixovirus), neumonía enzootica de los lechones (<i>Mycoplasma hyopneumoniae</i>), disentería porcina (<i>Treponema hyodysenteriae</i>), coccidiosis, balantidiasis, leptospirosis, tuberculosis. |
| 40 | En ovinos: | Adenomatosis pulmonar (γ herpesvirus), enfermedad de Aujeszky (α herpesvirus), parainfluenza-3 (paramixovirus), peste bovina (morbilivirus), septicemia hemorrágica (<i>Pasteurella hemolytica</i> , <i>Pasteurella multocida</i>), enteritis por coronavirus, campilobacteriosis, ectima contagioso, paratuberculosis, tuberculosis, coccidiosis, micoplasmosis, brucelosis, toxoplasmosis, erliquiosis. |
| 45 | En aves: | Laringotraqueitis infecciosa (α herpesvirus), enfermedad de Marek (γ herpesvirus), peste aviar (ortomixovirus), enfermedad de Newcastle (paramixovirus), Bronquitis infecciosa (coronavirus), leucosis aviar (oncovirus), enfermedad respiratoria crónica (<i>Mycoplasma gallisepticum</i>), sinovitis infecciosa (<i>Mycoplasma sinoviae</i>), coccidiosis, cólera aviar (<i>Pasteurella multocida</i>), aspergillosis. |

Asimismo, el EDL de la presente invención posee características de estabilidad de almacenamiento que le permite conservar sus propiedades terapéuticas a 4°C durante un periodo de 12 meses, preferentemente de 7 a 8 meses, mediante la aplicación de ozono en cantidades de 0,2 a 0,5 ppm, preferentemente hasta 0,3 ppm. De manera sorprendente, a pesar de que el ozono es una sustancia altamente reactiva y con propiedades reductoras, las propiedades terapéuticas del EDL obtenido en este trabajo no se modificaron, incrementándose únicamente el tiempo de conservación de los mismos.

Por otra parte, los métodos de obtención de EDL de la presente invención permiten la obtención de altos rendimientos a partir de tejidos linfoides, tales como linfonodos, bazo y timo por ejemplo, ya sea de animales previamente sensibilizados a antígenos relacionados con la enfermedad a tratarse o de animales no sensibilizados. Estos métodos permiten obtener EDL con concentraciones equivalentes a 6×10^6 a $1,6 \times 10^7$ leucocitos/ml a partir de sangre, de 1×10^7 a $8,3 \times 10^7$ leucocitos/g a partir de bazo, de 9×10^6 a 6×10^7 leucocitos/g a partir de timo y de $1,6 \times 10^7$ a $1,8 \times 10^9$ leucocitos/g a partir de linfonodos.

Por otra parte, los métodos de obtención de EDL de la presente invención permiten obtener una gran cantidad y variedad de dosis individuales de EDL para ser administradas en volúmenes pequeños al animal, con lo cual se evitan molestias innecesarias al paciente por su administración. Asimismo, esto permite la administración a un mayor número

de pacientes y ajustar la concentración del EDL con una mayor facilidad a las dosis necesarias según convenga durante el transcurso del tratamiento y sin obtener volúmenes considerables. Según una de las modalidades de la presente invención, el volumen obtenido de las dosis de EDL a administrarse al paciente puede fluctuar de 0,5 a 2 ml por dosis, preferentemente de 1 a 1,7 ml y más preferentemente de 1,3 a 1,5 ml.

Los rendimientos obtenidos de EDL en el presente trabajo, permiten obtener dosis individuales para cada esquema de tratamiento, con lo cual pueden obtenerse kits terapéuticos que contienen EDL en las cantidades y dosis adecuadas para el tratamiento de los pacientes. En general, pueden obtenerse kits de 6 a 10 dosis individuales de EDL, preferentemente de 6 a 8 dosis individuales para las enfermedades mencionadas con anterioridad.

Como una modalidad del kit terapéutico de la presente invención, los estuches comprenden dosis individuales iniciales al tratamiento de 3 a 300 veces más altas en concentración (de 3×10^6 a 5×10^8) que las dosis proporcionadas posteriormente (de 1×10^5 a $1,5 \times 10^6$).

En una modalidad preferente de kit terapéutico, éste puede estar conformado por dosis individuales de EDL en concentraciones equivalentes a 3×10^6 hasta 5×10^8 linfocitos. Tales dosis conformarían del 30 al 50% del total de dosis individuales contenidas en el estuche, mientras que el resto de las dosis individuales tendrían concentraciones de EDL equivalentes a 1×10^5 hasta $1,5 \times 10^6$ linfocitos, conformando del 50 al 70% del total de dosis individuales contenidas en el estuche.

Asimismo, la fuente de obtención del EDL de las dosis individuales iniciales del estuche, puede ser, preferentemente, de tejido linfático, preferentemente sanguíneo linfático y más preferentemente de bazo o timo; en relación a la fuente de obtención del EDL de las dosis individuales finales del estuche puede ser de tejido sanguíneo o linfático, preferentemente sanguíneo. Asimismo, los tejidos sanguíneos o linfáticos a partir de los que se obtiene el EDL, pueden derivarse de animales previamente sensibilizados o inmunizados con el antígeno de interés o bien sin sensibilización o inmunización previa.

La utilización médica de la presente invención comprende una selección previa de los pacientes a recibir el tratamiento, proceso en el cual se detectan signos clínicos importantes de la enfermedad, tales como reacciones positivas a pruebas de laboratorio, dentro de las que se encuentran solo para ilustrar la presente invención, las pruebas de aglutinación en placa, inmunofluorescencia directa en frotis de epitelio, microaglutinación sérica directa, examen coproparasitológico, seroneutralización, aislamiento bacteriano y diagnóstico anatomopatológico y microbiológico, entre otros.

El esquema de tratamiento desarrollado en el presente trabajo comprende la administración del EDL al paciente en dosis equivalentes a $1,0 \times 10^5$ leucocitos hasta 5×10^8 leucocitos por kg de peso, preferentemente a dosis equivalentes a $1,0 \times 10^6$ leucocitos hasta 5×10^8 leucocitos por kg de peso o bien, más preferentemente a dosis equivalentes a $1,5 \times 10^6$ leucocitos hasta 5×10^6 leucocitos por kg de peso. Tales dosis pueden ser aplicadas en dosis únicas o bien, cada 24 a 96 horas, preferentemente cada 48 horas y hasta un periodo de 15 a 30 días o bien, hasta la completa recuperación del paciente. La administración del EDL se realiza por vía parenteral, y aunque se prefiere la vía subcutánea, pueden ser utilizadas otras vías de administración.

Este esquema permite la administración de diferentes dosis del EDL con la finalidad de hacer responder al paciente de manera eficaz y mantener su recuperación hasta el completo restablecimiento de su estado de salud; por ello, en una modalidad del método de tratamiento de la presente invención, pueden administrarse dosis mayores de EDL en el 50% del total de dosis individuales administradas durante el tratamiento, preferentemente al inicio del mismo. El resto de las dosis individuales tendrían concentraciones menores como máximo en el 70% del total de dosis administradas. Preferentemente, el porcentaje de dosis individuales con concentraciones mayores al inicio del tratamiento sería del 30 al 50% del total de dosis individuales administradas, mientras que para dosis individuales con concentraciones menores sería del 50 al 70% del total de dosis individuales administradas. Asimismo la fuente de obtención del EDL administrado en las fases iniciales del tratamiento puede ser de tejido linfático, preferentemente sanguíneo linfático, y más preferentemente de bazo o timo; en relación a la fuente de obtención del EDL administrado en las fases finales y de mantenimiento del tratamiento puede ser de tejido sanguíneo o linfático, preferentemente sanguíneo.

Asimismo, como una modalidad adicional del tratamiento de la presente invención, pueden administrarse dosis individuales de la misma concentración equivalente a 1×10^5 hasta 5×10^8 leucocitos durante el transcurso del tratamiento, preferentemente a dosis equivalentes a 1×10^6 hasta 5×10^8 leucocitos o bien, o más preferentemente a dosis equivalentes a $1,5 \times 10^6$ hasta 5×10^6 leucocitos.

Los EDL de la presente invención pueden ser almacenados en envases diseñados para su aplicación terapéutica, tales como frascos de vidrio farmacéuticos que permiten su conservación, o bajo condiciones de refrigeración o congelación. Los extractos pueden ser obtenidos en forma líquida o bien en forma sólida después de someterlos a un tratamiento por liofilización u otro tratamiento que permita conservar sus cualidades terapéuticas. Si la forma de distribución elegida del EDL al paciente es por liofilizados, posteriormente el EDL puede ser reconstituido mediante la adición de agua inyectable estéril o algún otro medio líquido terapéuticamente conveniente para su administración.

Para los fines de la presente invención, el EDL puede ser obtenido a través de la siguiente metodología:

Obtención de extracto dializado de leucocitos (EDL)

La elaboración del EDL requiere diversos pasos y cada uno se puede llevar a cabo con diferentes técnicas de las cuales se mencionan las siguientes:

1. Selección y preparación del donante

El EDL puede ser elaborado a partir de los tejidos de un animal de la misma especie (homólogo) o de otra especie diferente a la del receptor (heterólogo), por lo que el individuo donante de linfocitos puede ser de cualquier especie. Si el objetivo es obtener EDL específico para algún antígeno, se requiere de la sensibilización antigénica del donante previa a la obtención de los linfocitos. La sensibilización puede realizarse inoculando repetidamente el microorganismo patógeno por vía intranasal, intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, subcutánea entre otras y obteniendo la muestra de leucocitos cuando se haya producido una respuesta inmune secundaria adecuada. En caso de carecer de microorganismo patógeno, se puede sustituir por aplicaciones en serie de vacuna o bien, bacterias o toxinas comerciales administradas por las mismas vías. También se puede determinar la sensibilización antigénica específica por pruebas inmunológicas específicas, tanto *in vitro* como *in vivo* que demuestren la exposición natural al antígeno específico. Si el objetivo es realizar EDL inespecífico, no es necesario realizar la sensibilización previa de los animales.

2. Recolección celular

La recolección de leucocitos se podrá llevar a cabo a partir de:

- a) Sangre, obteniéndose ésta, por ejemplo, por punción cardiaca, de la arteria carótida, femoral, caudal o del seno retro-orbitario, de las venas radial, cefálica, safena, yugular, o bien cualquier otro vaso que pudiera servir para este fin.
- b) Órganos linfoides primarios o secundarios, tales como timo, bazo o linfonodos.

En éste sentido y como un resultado de la presente invención, la utilización de órganos linfoides permite la obtención de rendimientos significativamente mayores a los obtenidos por los métodos conocidos utilizando como fuente de obtención tejido sanguíneo. Sin embargo, para los fines del presente trabajo, cualquiera de los tejidos mencionados puede ser utilizado para la obtención de EDL con actividad terapéutica.

La recolección de la sangre puede realizarse en bolsas para transfusión sanguínea o frascos estériles utilizando como anticoagulante heparina, ácido cítrico, dextrosa, citrato de sodio o EDTA. La recolección de órganos se podrá realizar utilizando bolsas o frascos estériles, se refrigerarán de manera inmediata y posteriormente se disgregarán mediante macerado y tamizado de los órganos.

3. Obtención de leucocitos y linfocitos

La separación de los leucocitos o linfocitos se realiza utilizando agentes separadores por gradiente de concentración como el "ficoll hypacke", por separación manual con pipetas tras centrifugar las muestras, permitiendo la sedimentación del paquete celular sanguíneo con la utilización, de potenciadores de sedimentación, tales como el fibrinógeno y otros, o sin ellos, o bien a través de la utilización de la prensa francesa o algún otro medio o metodología conocida para fines de separación celular.

4. Lisis celular

La lisis de los leucocitos se puede realizar utilizando métodos de ruptura celular como el ultrasonido, microondas, agentes químicos, diferenciales de presión osmótica con agua destilada o utilizando métodos de lisis por cambio de temperatura y para este fin se puede utilizar la congelación de los concentrados de leucocitos con nitrógeno líquido, refrigeración a diversas temperaturas (por ejemplo -20°C o -70°C), la congelación convencional a 4°C, la mezcla de hielo seco-acetona y el posterior calentamiento de la muestra en baño maría a 37°C, repitiendo el procedimiento las veces que sean necesarias. En todos los casos se verifica que la lisis se haya completado a través de la observación microscópica del tejido.

5. Separación de moléculas

La separación de las moléculas de los lisados de leucocitos, se puede llevar a cabo a través de membranas de diálisis con la capacidad de retener moléculas mayores de 10.000 a 12.000 Daltones o utilizando la ultrafiltración con bomba peristáltica y membranas con microporos menores de 10.000 a 12.000 Daltones. La diálisis se realiza con agua destilada o bien con algún tampón convencional.

El vehículo empleado para suspender las moléculas obtenidas en el proceso de separación mediante diálisis puede ser agua destilada o inyectable y para el proceso de ultrafiltración solución salina fisiológica, solución salina tamponada o solución Hartman.

6. Esterilización

El extracto de leucocitos obtenido es esterilizado por burbujeo con ozono a 0,3 ppm.

7. Conservación

El extracto puede conservarse en refrigeración o congelación a temperaturas inferiores a 4°C, ya sea en forma líquida o después de realizar un proceso de liofilización. Se le puede adicionar alguna combinación de antibióticos de amplio espectro para el mismo fin. Asimismo, se deberá envasar en frascos de vidrio debidamente sellados para su almacenamiento.

Los siguientes ejemplos específicos ilustran la aplicación de la invención que permite utilizar el EDL para el tratamiento de diversas enfermedades en animales. Hay que considerar que otros ejemplos podrían ser aplicados para las enfermedades infecciosas más comunes en algunas especies animales por alguna persona con conocimientos medios en la materia, por lo que la presente invención no se limita a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Obtención de EDL a partir de tejido sanguíneo

Se obtuvo sangre a partir del animal donante seleccionado mediante punción con jeringa de la arteria femoral, vena radial, cefálica, safena o yugular, según las condiciones del donante. La sangre fue recolectada mediante bolsas de transfusión comerciales para utilización humana conectadas a la jeringa mediante mangueras, con capacidad de 500 ml, que contenían citrato de sodio como anticoagulante. Durante la recolección de la sangre, la bolsa se mantuvo en constante agitación ligera y por debajo de la zona de punción. Una vez contenida la sangre dentro de la bolsa, se tomó una muestra y se realizó un conteo leucocitario mediante observación microscópica por duplicado, utilizando pipetas de Thomas, líquido de Turk, y cámara de Newbauer. Después del conteo, la sangre se sometió a centrifugación a 1.200 rpm durante 20 minutos utilizando una centrífuga con contenedores con una capacidad de 500 ml.

Una vez terminada la centrifugación, se retiró la bolsa del contenedor y se colocó en una superficie previamente esterilizada con cloro y luz ultravioleta, sujetándola con pinzas quirúrgicas por los 2 extremos superiores de manera que la bolsa quedara colgando para realizar posteriormente un corte en la parte antero-superior. La fase final del líquido contenido en la bolsa fue separada del paquete celular con pipetas de vidrio y se depositó en un frasco de vidrio con tapa hermética, siendo congelada finalmente. Los leucocitos obtenidos de este modo fueron lisados por congelación a -20°C mediante un congelador comercial y calentamiento inmediato a 38°C en baño maría. El proceso de congelación-descongelación se realizó 10 veces y se comprobó la existencia de lisis en el 98% de las células mediante conteo a través de cámara de Newbauer mediante observación microscópica. La mezcla obtenida se dializó con agua inyectable guardando una relación entre el volumen de ésta y el volumen contenido en la bolsa de diálisis de 2:1 respectivamente. La diálisis se realizó durante 48 horas a 4°C mediante membranas de diálisis con capacidad de retención de moléculas mayores a 12.000 Daltones (Sigma 50, diámetro 49 por mm), previamente lavadas y esterilizadas, colocadas en un frasco de vidrio. Terminado el proceso de diálisis, se retiró la membrana y el líquido contenido en el frasco de vidrio fue esterilizado mediante burbujeo con 0,3 ppm de ozono durante 5 a 10 min. Posteriormente el líquido resultante fue repartido manualmente con jeringas de plástico en envases de vidrio con capacidad de 3 ml. Una vez realizado el llenado de 10 frascos, se colocaron tapas de goma estériles y se sellaron con gárgolas de aluminio. Los frascos con el EDL se almacenaron en refrigeración o congelación hasta su utilización. Mediante éste método se obtuvieron de 6.000 a 16.000 leucocitos por μ l de sangre. Asimismo, en relación al número de dosis a una concentración equivalente de $1,5 \times 10^6$ leucocitos, se obtuvieron 10 dosis por cada 13,6 ml de sangre.

Ejemplo 2

Obtención de EDL a partir de tejido linfático

Se recolectó el órgano linfático de interés (bazo, timo, linfonodos) de individuos sanos los cuales fueron sometidos a eutanasia con anestésicos, mediante extracción quirúrgica; una vez separados de residuos de tejido de órganos circundantes y limpiados con agua destilada, se mantuvieron en congelación (-17°C) hasta su procesamiento. El órgano se colocó en un frasco previamente esterilizado y se adicionaron de 50 a 250 ml de solución salina fisiológica. Posteriormente se tomó una muestra de aproximadamente 1 g de peso, la cual se maceró con 1 ml de solución salina fisiológica utilizando una microrejilla metálica, tomándose 5 μ l con una pipeta de Thomas y diluyéndose con líquido de Turk. La muestra se colocó en una cámara de Newbauer y se realizó un conteo celular mediante microscopía. Al

ES 2 353 208 T3

mismo tiempo, el órgano fue cortado en pequeños trozos con tijeras quirúrgicas y macerado con una licuadora previamente esterilizada utilizando de 50 a 200 ml de solución salina fisiológica. El macerado resultante se colocó en frascos de vidrio con tapa hermética y fue congelado.

5 Los leucocitos obtenidos de este modo fueron lisados por congelación a -20°C mediante un congelador comercial y posterior calentamiento inmediato a 38°C en baño maría. El proceso de congelación-descongelación se realizó 10 veces y se comprobó la existencia de lisis en el 98% de las células mediante conteo a través de cámara de Newbauer mediante observación microscópica. La mezcla obtenida se dializó con agua inyectable guardando una relación entre el volumen de ésta y el volumen contenido en la bolsa de diálisis de 2:1 respectivamente. La diálisis se realizó durante 10 48 horas a 4°C mediante membranas de diálisis con capacidad de retención de moléculas mayores a 12.000 Daltones (Sigma 50, diámetro 49 por mm), previamente lavadas y esterilizadas, colocadas en un frasco de vidrio. Terminado el proceso de diálisis, se retiró la membrana y el líquido contenido en el frasco de vidrio fue esterilizado mediante burbujeo con 0,3 ppm de ozono durante un periodo de 5 a 10 min. Posteriormente el líquido resultante fue repartido 15 10 frascos, se colocaron tapas de goma estériles y se sellaron con gárgolas de aluminio. Los frascos con el EDL se almacenaron en congelación hasta su utilización.

Mediante éste método se obtuvieron de 10.000 a 70.000 leucocitos por μg de tejido en el caso de bazo, de 9.000 a 60.000 leucocitos por μg de tejido en el caso de timo y de 16.000 a 230.000 leucocitos por μg de tejido en el 20 caso de linfonodos. Asimismo, en relación al número de dosis a una concentración equivalente de $1,5 \times 10^6$ leucocitos, se obtuvieron 10 dosis por cada 1,8 g de bazo, 10 dosis por cada 4,4 g de timo y 10 dosis por cada 0,08 g de linfonodos.

El EDL se obtuvo a partir de animales sensibilizados a la enfermedad tratada en el ensayo clínico correspondiente, 25 previamente al sacrificio se inmunizaron con dosis de vacuna que contenía el antígeno de interés con programas particulares de administración según lo requerido en el ensayo.

Ejemplo 3

30 *Obtención de EDL de sangre de canino*

Se utilizaron perros Rottweiler adultos como donantes de sangre, clínicamente sanos, con sus calendarios de vacunación completos y vigentes (vacuna antirrábica, triple y parvovirus), desparasitados anualmente y con un adecuado 35 estado nutricional. De los donantes se obtuvieron 450 ml de sangre completa mediante sangría y con la finalidad de obtener EDL, el EDL se procesó según lo especificado en el ejemplo no. 1, se obtuvo el EDL de animales sensibilizados a la enfermedad tratada en el ensayo clínico correspondiente, a los que se les había aplicado una dosis de vacuna que contenía el antígeno de interés 15 días antes de su sangría. Las donaciones sanguíneas se realizaron cada 60 días hasta finalizar el ensayo clínico correspondiente.

Ejemplo 4

45 *Obtención de EDL de sangre de bovino*

Se utilizó sangre de toro raza Holstein clínicamente sano de un año y seis meses de edad, vacunado exclusivamente contra brucelosis y sin ningún antecedente de vacunación contra rinotraqueitis viral bovina, parainfluenza, leptospirosis, pasteurelisis, carbón sintomático ni edema maligno. De los donantes se obtuvieron 450 ml de sangre completa 50 mediante sangría y con la finalidad de obtener EDL, se procesó según lo especificado en el ejemplo no. 1. El EDL se obtuvo a partir de animales sensibilizados a la enfermedad tratada en el ensayo clínico correspondiente, a los cuales se aplicó por vía subcutánea una dosis doble de vacuna triple canina (moquillo canino, hepatitis y leptospira) 30, 20 y 10 días previos a la recolección sanguínea.

Ejemplo 5

Obtención de EDL de sangre de porcino

Se utilizó sangre de cerdo no sensibilizado criado en una granja comercial. De los donantes se obtuvieron 450 60 ml de sangre completa mediante sangría y con la finalidad de obtener EDL, se procesó según lo especificado en el ejemplo no. 1. El EDL se obtuvo a partir de animales sensibilizados a la enfermedad tratada en el ensayo clínico correspondiente, los cuales se inmunizaron con dosis de vacuna que contenía el antígeno de interés con programas particulares de administración según lo requerido en el ensayo.

Ejemplo 6

Obtención de EDL de sangre equina

Se utilizó sangre de caballo criollo adulto, clínicamente sano, no sensibilizado, proveniente de un rastro. De los donantes se obtuvieron 15 litros de sangre completa mediante sangría y con la finalidad de obtener EDL, se procesó según lo especificado en el ejemplo no. 1. En el caso de que el EDL se obtuviera a partir de animales sensibilizados a la enfermedad tratada en el ensayo clínico correspondiente, éstos se inmunizaron con dosis de vacuna que contenía el antígeno de interés con programas particulares de administración conforme lo requería el ensayo.

Ejemplo 7

Estandarización de la dosis de EDL

Previo a la lisis de los leucocitos, el número de éstos, obtenidos del proceso de separación, fue contabilizado mediante cámara de Newbawer. Después de obtenerse la cuenta de leucocitos de los 4 cuadrantes de la cámara, las cantidades obtenidas se sumaron y se multiplicaron por 50 para obtener así el número total de leucocitos por μ l contenido en el líquido. Después de realizada la lisis celular, para obtener la dosis adecuada a aplicarse en los ensayos, ésta se calculó con respecto al número total de células antes de la lisis y posteriormente se realizaron diluciones adecuadas con agua destilada estéril hasta su obtención. Las dosis obtenidas se ajustaron a un volumen total de 1,5 ml, dosis adecuada para un animal de 10 kg de peso. Para los fines de la presente invención, para referirse a las dosis obtenidas tal como se describió en este ejemplo, se denominarán como “dosis equivalente a (número) de leucocitos”.

Ejemplo 8

Selección de pacientes caninos para el tratamiento de la enfermedad

Para que un paciente pudiera ser considerado como candidato a ingresar al ensayo clínico debió cumplir con los siguientes criterios:

Para el caso de moquillo canino:

1. De inclusión: presentar signos clínicos indicativos de infección de la enfermedad, no presentar signos neurológicos antes de iniciar el tratamiento y demostrar la infección viral mediante la prueba de inmunofluorescencia directa en frotis de epitelio conjuntival, sanguíneo o vesical.
2. De exclusión: no tener propietario, padecer desnutrición severa, sufrir otras enfermedades o patologías concurrentes.
3. De eliminación: suspensión del tratamiento, muerte por otra causa diferente a la infección por moquillo, extravío del paciente, no tener al paciente bajo techo y cobijo, y no aportarle la dieta prescrita.

Para el caso de leptospirosis:

1. De inclusión: presentar signos clínicos indicativos de infección por *Leptospira interrogans*, demostrar la infección mediante la prueba de microaglutinación sérica directa con títulos superiores a 1/100.
2. De exclusión: no tener propietario, padecer desnutrición severa, padecer deshidratación moderada a severa, tener signos de uremia, presentar niveles de creatinina mayores de 2 mg/dl, sufrir otras enfermedades o patologías concurrentes.
3. De eliminación: suspensión del tratamiento, muerte durante el desarrollo del ensayo clínico, no aportarle la dieta prescrita.

Ejemplo 9

Preparación previa al tratamiento

Los pacientes incluidos en los ensayos recibieron terapia antimicrobiana, previamente a la administración de EDL. La terapia consistió de la administración de amoxicilina (11 mg/kg cada 12 horas, vía oral) y gentamicina (4 mg/kg cada 24 horas, vía intramuscular) durante 7 días. Cada paciente fue evaluado de manera individual y se le aplicaron las medidas terapéuticas necesarias para su estabilización clínica. Para cada uno de los pacientes incluidos en los ensayos, se calcularon las necesidades energéticas (en base a la fórmula $[\text{peso corporal} \times 30 + 70] \times 2$), las cuales se aportaron con alimento comercial seco granulado. Se mantuvo al paciente bajo techo y cobijo las 24 horas del día mientras duró el tratamiento, permitiendo solo salidas momentáneas para la excreción de deyecciones fecales y orina.

ES 2 353 208 T3

Ejemplo 10

Evaluación de los resultados

- 5 Los criterios de discriminación de éxito o fracaso del tratamiento fueron de vivo o muerto o bien de positivo o negativo a la prueba de aglutinación en placa, según el ensayo correspondiente. Los resultados obtenidos, a menos que se indique lo contrario, se sometieron a una evaluación estadística mediante la prueba de Ji-cuadrada.

10 Ejemplo 11

Tratamiento de moquillo canino con EDL de sangre de perro sensibilizado

- 15 Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, longitudinal y observacional en el que se utilizó EDL obtenido de sangre de perro sensibilizado a moquillo canino (como se muestra en el ejemplo no. 3), se utilizó una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de aplicación de 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento del moquillo canino. Para dicho ensayo se utilizaron 370 perros infectados naturalmente con el virus de moquillo canino y se incluyeron alternativamente en el grupo A o en el grupo B, con lo cual 185 animales se integraron en el grupo A, y los otros 185 perros formaron el grupo B. Los perros fueron seleccionados según lo descrito en el ejemplo no. 8 y no se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas. Asimismo, los pacientes fueron tratados previamente al tratamiento con EDL según lo indicado en el ejemplo no. 9.

- Después de obtenido el extracto, éste se estandarizó a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según como se muestra en el ejemplo no. 7.

- 25 A los perros incluidos en el grupo A se les aplicó por vía subcutánea EDL a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con un intervalo entre dosis de 48 horas durante 10 días, seguido de intervalos entre dosis de cada 96 horas hasta que el paciente estuviera 15 días clínicamente sano o hasta su muerte. A los animales del grupo B se les aplicó solución salina fisiológica, con la misma frecuencia de aplicación que en el grupo A. El grupo A, tuvo un recorrido poblacional de un mes a ocho años (media de dos años y cinco meses), siendo el 60,5% de la población menor de un año de edad. El grupo B, presentó un recorrido poblacional de dos meses a siete años, (media de dos años y un mes), siendo el 65,7% de la población menor de un año de edad. Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

35

Grupo	Dosis de EDL*	Supervivencia**	Mortalidad**
A	$1,5 \times 10^6$	90	10
B	-	13	87
* Por kg de peso **Expresado en porcentaje			

40

45

Después de la evaluación de los resultados como se indica en el ejemplo no. 10, bajo el diseño de este ensayo clínico la aplicación de EDL en el tratamiento de moquillo canino incrementa notablemente la supervivencia de los perros afectados a niveles altamente significativos ($p \leq 0,01$).

50

Ejemplo 12

Tratamiento canino de moquillo canino con diferentes dosis de EDL de sangre de perro sensibilizado

- 55 En este ejemplo se describe la utilización del EDL obtenido de sangre de perro sensibilizado (como se muestra en el ejemplo no. 3) a dosis equivalente a 5×10^8 leucocitos en dosis única, 5×10^6 leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 10 días, $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 10 días y 1×10^5 leucocitos por kg durante 10 días, por vía subcutánea, en perros enfermos de moquillo canino. En este ensayo se utilizaron 50 perros de tres meses a un año de edad, infectados naturalmente con el virus de moquillo canino, los cuales se numeraron e incluyeron progresivamente en los grupos A, B, C, D o E según el momento en que se presentaran para su atención, con lo cual se integraron cinco grupos de 10 perros cada uno. Los pacientes fueron seleccionados según lo descrito en el ejemplo no. 8 y no se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas. Asimismo, los pacientes fueron tratados previamente al tratamiento con EDL según lo indicado en el ejemplo no. 9.

- 65 A los perros incluidos en el grupo A se les aplicó EDL a una dosis equivalente a 5×10^8 leucocitos en aplicación única. A los animales del grupo B se les aplicó una dosis equivalente a 5×10^8 leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 10 días. Al grupo C se le aplicó una dosis de EDL equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg

ES 2 353 208 T3

de peso corporal cada 48 horas durante 10 días. Para los perros del grupo D se utilizó una dosis equivalente a 1×10^5 leucocitos por kg cada 48 horas durante 10 días. A los perros del grupo E se les aplicó solución salina fisiológica. En todos los pacientes se utilizó la vía subcutánea. Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Dosis de EDL*	Supervivencia**	Mortalidad**
A	5×10^8	80	20
B	5×10^6	100	0
C	$1,5 \times 10^6$	100	0
D	1×10^5	50	50
E	-	0	100
* Por kg de peso **Expresado en porcentaje			

Después de la evaluación de los resultados tal como se indica en el ejemplo no. 10, bajo el diseño de este ensayo clínico, la aplicación de EDL en el tratamiento de moquillo canino de los perros tratados con las dosis de EDL de los grupos A, B, C incrementa estadísticamente la supervivencia de los perros afectados a niveles altamente significativos ($p \geq 0,01$) al compararlos con el grupo control (grupo E). Al analizar los resultados obtenidos de los tratamientos de los perros de los grupos A, B y C no se observó diferencia estadísticamente significativa ($p \geq 0,05$), sin embargo entre los tratamientos de los perros de los grupos B y C los tratamientos fueron mejores con diferencias significativas ($p \leq 0,05$) al compararlo con el grupo D.

Ejemplo 13

Tratamiento de moquillo canino con EDL de sangre de perro sensibilizado, linfonodos y bazo

Este ejemplo describe la utilización de EDL obtenido a partir de sangre (tal como se muestra en el ejemplo no. 3), linfonodos y bazo de perro para el tratamiento de moquillo canino. En este caso, se utilizaron 45 perros de cuatro meses a un año de edad, infectados naturalmente con el virus de moquillo canino, los cuales se numeraron y se incluyeron progresivamente en los grupos A, B y C según el momento en que se presentaran para su atención, con lo cual se integraron tres grupos de 15 perros cada uno. Los perros fueron seleccionados según lo descrito en el ejemplo no. 8 y no se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas. Asimismo, los pacientes fueron tratados previamente al tratamiento con EDL según lo indicado en el ejemplo no. 9.

Para la elaboración de EDL a partir de tejido, se utilizaron linfonodos y bazos de perros sacrificados diferentes de los donantes de los linfonodos tal como se describe en el ejemplo no. 2. Después de obtenido el extracto, éste se estandarizó a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7.

A los perros incluidos en el grupo A se les aplicó una dosis de EDL de origen sanguíneo equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 72 horas durante 10 días seguido de aplicaciones durante otros 15 días cada 48 horas. Al grupo B se le aplicó EDL de linfonodos a la misma dosis y frecuencia de aplicación. Para los perros del grupo C se utilizó EDL preparado de bazo a la misma dosis de leucocitos y a la misma frecuencia que a los perros de los grupos A y B. En todos los pacientes se utilizó la vía de aplicación subcutánea. Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Fuente de EDL*	Supervivencia**	Mortalidad**
A	Sangre	93,3	6,7
B	Linfonodos	86,7	13,3
C	Bazo	93,3	6,7
* Canino. **Expresado en porcentaje.			

Después de la evaluación de los resultados, tal como se indica en el ejemplo no. 10, bajo el diseño de este ensayo clínico se puede afirmar que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los tres grupos de estudio ($p > 0,01$) al utilizar EDL de diferentes tejidos (sangre, linfonodos y bazo).

Ejemplo 14

Tratamiento de moquillo canino con EDL de sangre de bovino sensibilizado y no sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, transversal, observacional que describe la utilización de EDL obtenido de sangre de bovinos sensibilizados, con vacuna triple canina, y no sensibilizados. Aplicado a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de aplicación de cada 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento del moquillo canino. En este caso, se utilizaron 45 perros de cuatro meses a un año de edad, infectados naturalmente con el virus de moquillo canino, los cuales se numeraron y se incluyeron progresivamente en los grupos A, B y C según el momento en que se presentaran para su atención, con lo cual se integraron tres grupos de 15 perros cada uno. Los perros fueron seleccionados según lo descrito en el ejemplo no. 8 y no se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas. Asimismo, los pacientes fueron tratados previamente al tratamiento con EDL según lo indicado en el ejemplo no. 9.

El extracto de linfocitos (EDL) de bovino se obtuvo según se describe en el ejemplo no. 4, mientras que el EDL de perro fue obtenido según se muestra en el ejemplo no. 3. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7.

A los perros incluidos en el grupo A se les aplicó por vía subcutánea una dosis de EDL de origen bovino sensibilizado equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 10 días y cada 72 horas durante 15 días. Al grupo B se le aplicó una dosis de EDL de origen bovino no sensibilizado por la misma vía, y frecuencia de aplicación. Y al grupo C se le aplicó EDL de origen canino de forma idéntica que en los otros dos grupos.

Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Origen del EDL*	Supervivencia**	Mortalidad**
A	Bovino sensibilizado	100	0
B	Bovino no sensibilizado	93,3	6,7
C	Canino no sensibilizado	93,3	6,7
* Sangre. **Expresado en porcentaje.			

Después de la evaluación de los resultados, tal como se indica en el ejemplo no. 10, bajo el diseño de este ensayo clínico se puede afirmar que no hay diferencia estadística entre los tres grupos de estudio ($p > 0,01$) al utilizar EDL de bovino sensibilizado, bovino no sensibilizado o perro no sensibilizado para tratar el moquillo canino.

Ejemplo 15

Tratamiento de moquillo canino con EDL de linfonodos y bazo de bovino sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, transversal, observacional que describe la utilización del EDL obtenido de linfonodos y bazo de bovinos sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^8$ leucocitos por kg de peso con intervalos de aplicación de 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento del moquillo canino. En este ensayo se utilizaron 45 perros de cuatro meses a un año de edad, infectados naturalmente con el virus del moquillo canino, los cuales se numeraron y se incluyeron progresivamente en los grupos A, B y C según el momento en que se presentaran para su atención. Con esta estrategia se integraron tres grupos de 15 perros cada uno. Los perros fueron seleccionados según lo descrito en el ejemplo no. 8 y no se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas. Asimismo, los pacientes fueron tratados previamente al tratamiento con EDL según lo indicado en el ejemplo no. 9.

Para la elaboración de EDL a partir de tejido, se utilizaron linfonodos y bazos de bovinos criollos adultos obtenidos de un rastro municipal, los cuales una vez limpiados fueron mantenidos en congelación (-17°C) hasta su procesamiento, según se muestra en el ejemplo no. 2. Cabe citar que se desconocía la edad, sexo, vacunaciones previas y tipo de alimentación de los animales donantes. El EDL de sangre de perro fue obtenido según se muestra en el ejemplo no. 3. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7.

ES 2 353 208 T3

A los perros incluidos en el grupo A se les aplicó por vía subcutánea el EDL de origen esplénico bovino no sensibilizado a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 10 días y cada 72 horas durante 15 días. Al grupo B se le aplicó EDL de origen linfonodo bovino no sensibilizado por la misma vía, dosis y frecuencia de aplicación. Al grupo C se le aplicó EDL de origen hemático canino de idéntica forma que en los otros dos grupos.

Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Fuente de EDL ⁺	Supervivencia ^{**}	Mortalidad ^{**}
A	Bazo	86,6	13,3
B	Linfonodos	93,3	6,7
C	Sangre [*]	100	0
+ Bovino sensibilizado **Expresado en porcentaje [*] Canino sensibilizado.			

Después de la evaluación de los resultados, tal como se indica en el ejemplo no. 10, bajo el diseño de este ensayo clínico se puede afirmar que no hay diferencia estadística significativa entre los tres grupos de estudio ($p > 0,05$) al utilizar EDL de bazo o linfonodo de bovino sensibilizado al compararlo con el EDL elaborado con sangre de perro sensibilizado para tratar moquillo canino.

Ejemplo 16

Tratamiento de moquillo canino con EDL de sangre, linfonodos y bazo de cerdo sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, transversal, observacional que describe la utilización del EDL obtenido de sangre, linfonodos y bazo de cerdos sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de cada aplicación de 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento del moquillo canino. En este ensayo se utilizaron 40 perros de cuatro meses a un año de edad, infectados naturalmente con el virus canino de moquillo canino, los cuales se numeraron y se incluyeron progresivamente en los grupos A, B, C y D según el momento en que se presentaran para su atención. Con esta estrategia se integraron cuatro grupos de 10 perros cada uno. Los perros fueron seleccionados según lo descrito en el ejemplo no. 8 y no se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas. Asimismo, los pacientes fueron tratados previamente al tratamiento con EDL según lo indicado en el ejemplo no. 9.

Para la elaboración del EDL se utilizaron linfonodos, bazos y sangre de 3 cerdos criados en una granja comercial, los cuales fueron inmunizados dos veces con dosis dobles de vacuna triple canina (moquillo canino, hepatitis, leptospira) con intervalos entre dosis de 10 y 15 días previos al sacrificio. Los extractos fueron obtenidos según se describe en el ejemplo no. 2. El EDL de sangre de perro fue obtenido según se describe en el ejemplo no. 3. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7.

A los perros incluidos en el grupo A se les aplicó por vía subcutánea el EDL de origen esplénico porcino sensibilizado a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 10 días y cada 72 horas durante 15 días. Al grupo B se le aplicó EDL de linfonodo porcino sensibilizado por la misma vía, dosis y frecuencia de aplicación. Al grupo C se le aplicó EDL de origen hemático porcino de idéntica forma que en los otros dos grupos. Finalmente se inyectó por la misma vía y a la misma dosis EDL de origen sanguíneo canino sensibilizado a los perros del grupo D. Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Fuente de EDL [*]	Supervivencia ^{**}	Mortalidad ^{**}
A	Bazo	80	20
B	Linfonodos	90	10
C	Sangre	90	10
D	Sangre ⁺	100	0
* Cerdo sensibilizado. + Canino sensibilizado **Expresado en porcentaje.			

ES 2 353 208 T3

Después de la evaluación de los resultados, tal como se indica en el ejemplo no. 10, bajo el diseño de este ensayo clínico se puede afirmar que no hay diferencia estadística entre los cuatro grupos de estudio ($p > 0,05$) al utilizar EDL de sangre, bazo o linfonodo de cerdos sensibilizados y EDL elaborado con sangre de perro sensibilizado para tratar moquillo canino.

Ejemplo 17

Tratamiento de moquillo canino con EDL de sangre, linfonodos y bazo de caballo no sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, transversal, observacional que describe la utilización del EDL obtenido de sangre, linfonodos y bazo de caballos no sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de cada aplicación de 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento del moquillo canino. En este ensayo se utilizaron 40 perros de cuatro meses a un año de edad, infectados naturalmente con el virus de moquillo canino, los cuales se numeraron y se incluyeron progresivamente en los grupos A, B, C y D según el momento en que se presentaran para su atención. Con esta estrategia se integraron cuatro grupos de 10 perros cada uno. Los perros fueron seleccionados según lo descrito en el ejemplo no. 8 y no se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas. Asimismo, los pacientes fueron tratados previamente al tratamiento con EDL según lo indicado en el ejemplo no. 9.

Para la elaboración del EDL se utilizaron linfonodos, bazos y sangre de equinos sacrificados en un rastro municipal. Los extractos fueron obtenidos según se describe en el ejemplo no. 2. El EDL de sangre de perro fue obtenido según se muestra en el ejemplo no. 3. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7.

A los perros incluidos en el grupo A se les aplicó por vía subcutánea el EDL de origen esplénico equino no sensibilizado a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 10 días y cada 72 horas durante 15 días. Al grupo B se le aplicó EDL de linfonodo equino no sensibilizado por la misma vía, dosis y frecuencia de aplicación. Al grupo C se le aplicó EDL de origen hemático equino de idéntica forma que en los otros dos grupos. Finalmente, al grupo D se le aplicó EDL de sangre canina con los mismos criterios de aplicación que los grupos anteriores. Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Fuente de EDL*	Supervivencia**	Mortalidad**
A	Bazo	90	10
B	Linfonodos	90	10
C	Sangre	100	0
D	Sangre ⁺	90	10
* Equino no sensibilizado **Expresado en porcentaje ⁺ Canino sensibilizado			

Después de la evaluación de los resultados, tal como se indica en el ejemplo no. 10, bajo el diseño de este ensayo clínico se puede afirmar que no hay diferencia estadística entre los tres grupos de estudio ($p > 0,05$) al utilizar EDL de origen hemático, esplénico o linfático de equino no sensibilizado y EDL elaborado con sangre de perro sensibilizado para tratar moquillo canino.

Ejemplo 18

Tratamiento de leptospirosis canina con EDL de bazo de perro sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, transversal, observacional que describe la utilización de EDL obtenido de bazo de perros sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de cada aplicación de 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento de la leptospirosis canina. En este ensayo se utilizaron 30 perros, infectados naturalmente con *Leptospira interrogans*, los cuales se numeraron por orden de aparición y se incluyeron alternativamente en los grupos A y B según el momento en que se presentaran para su atención. Con esta disposición se integraron dos grupos de 15 perros cada uno. Los perros fueron seleccionados según lo descrito en el ejemplo no. 8 y no se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas. Para cada uno de los pacientes incluidos en los ensayos, se calcularon las necesidades energéticas (en base a la fórmula $[\text{peso corporal} \times 30 + 70] \times 2$), las cuales se aportaron con alimento comercial seco granulado. Se mantuvo al perro bajo techo y cobijo las 24 horas del día mientras duró el tratamiento, permitiendo solo salidas momentáneas para la excreción de deyecciones fecales y orina.

ES 2 353 208 T3

Para la elaboración de EDL a partir de tejido, se utilizaron bazos de perros sacrificados, tal como se describe en el ejemplo no. 2. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración de $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7. A los perros incluidos en el grupo A se les aplicó por vía subcutánea el EDL a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 15 días. Al grupo B se le aplicó penicilina G procaínica (40.000 U/kg) y estreptomicina (22 mg/kg) cada 24 horas durante 15 días.

Los signos clínicos se describieron desde el inicio del ensayo y cada 7 días, de la siguiente manera:

- 0, cuando no hay signos.
- 1, cuando el paciente presentaba solo signos prodrómicos.
- 2, cuando los signos específicos se limitaban a vómito, diarrea, poliuria, hematuria.
- 3, cuando se observaba ictericia, hematuria, diarrea con melena, hematemesis.

Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en las siguientes tablas:

Valoración clínica del grupo A				
Perro	Evaluación inicial	Día 7	Día 14	Día 21
1	3	3	2	1
2	2	2	1	0
3	2	2	0	0
4	3	2	1	0
5	3	1	0	0
6	2	1	0	0
7	3	2	1	0
8	3	2	0	0
9	2	1	0	0
10	2	0	0	0
11	2	2	1	1
12	3	1	0	0
13	2	1	1	0
14	2	1	0	0
15	2	0	0	0

ES 2 353 208 T3

Valoración clínica del grupo B				
Perro	Evaluación inicial	Día 7	Día 14	Día 21
1	2	1	0	0
2	2	2	1	0
3	3	2	0	0
4	3	2	1	1
5	2	0	0	0
6	2	1	1	0
7	3	2	1	0
8	2	2	0	0
9	3	1	1	0
10	3	2	2	0
11	3	2	0	0
12	2	1	0	0
13	2	1	1	1
14	3	1	0	0
15	3	2	1	1

Asimismo, para estos grupos se realizó un análisis serológico al inicio del tratamiento así como otro 21 días después para detectar anticuerpos anti-*Leptospira* mediante la técnica de microaglutinación con antígeno vivo.

Los resultados de esta prueba se muestran a continuación:

Títulos de anticuerpos anti- <i>Leptospira</i> . Grupo A			
Perro	Título inicial	Título 21 días	Serovariedad
1	1/3200	1/50	<i>L. pomona</i>
2	1/400	-	<i>L. pomona</i>
3	1/800	-	<i>L. grippotyphosa</i>
4	1/1600	-	<i>L. pyrogenes</i>
5	1/400	-	<i>L. canicola</i>
6	1/200	1/50	<i>L. wolffi</i>
7	1/800	1/100	<i>L. icterohemorrhagiae</i>
8	1/3200	1/800	<i>L. grippotyphosa</i>
9	1/400	1/100	<i>L. autumnalis</i>
10	1/100	-	<i>L. canicola</i>
11	1/100	-	<i>L. pomona</i>
12	1/400	-	<i>L. tarassovi</i>
13	1/200	-	<i>L. hardjo</i>
14	1/100	-	<i>L. icterohemorrhagiae</i>
15	1/100	-	<i>L. pomona</i>

ES 2 353 208 T3

Títulos de anticuerpos anti-Leptospira. Grupo B			
Perro	Título inicial	Título 21 días	Serovariedad
1	1/400	-	<i>L. pyrogenes</i>
2	1/200	-	<i>L. canicola</i>
3	1/1600	1/100	<i>L. canicola</i>
4	1/3200	1/200	<i>L. icterohemorrhagiae</i>
5	1/100	-	<i>L. grippotyphosa</i>
6	1/100	-	<i>L. pomona</i>
7	1/800	1/50	<i>L. pomona</i>
8	1/400	1/50	<i>L. tarassovi</i>
9	1/800	-	<i>L. wolffi</i>
10	1/1600	1/100	<i>L. wolffi</i>
11	1/1600	1/50	<i>L. pyrogenes</i>
12	1/200	-	<i>L. canicola</i>
13	1/200	-	<i>L. pomona</i>
14	1/800	-	<i>L. ballum</i>
15	1/400	-	<i>L. hardjo</i>

Los resultados obtenidos se sometieron a una evaluación estadística. En el caso de la valoración de los signos clínicos, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y para el caso de la microaglutinación la prueba de t de Student. Después de la evaluación de los resultados, bajo el diseño de este ensayo clínico, se puede afirmar que no hay diferencia estadística significativa entre los grupos de estudio ($p > 0,05$) al utilizar EDL de origen canino no sensibilizado y el tratamiento con compuestos antimicrobianos. En otras palabras, ambos tratamientos resultaron igualmente eficaces contra la leptospirosis canina.

Ejemplo 19

Tratamiento de brucelosis canina con EDL del bazo de un perro no sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, transversal y observacional que describe la utilización del EDL obtenido de bazo de perros no sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de aplicación de cada 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento de la brucelosis canina. En este ensayo se utilizaron 26 perros asintomáticos, infectados naturalmente con *Brucella canis*, que fueron diagnosticados en una población canina abierta de un consultorio veterinario, los cuales se numeraron por orden de diagnóstico positivo y se incluyeron alternativamente en los grupos A y B según el momento en que se detectó su positividad. Con esta disposición se integraron dos grupos de 13 perros cada uno. No se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas y los pacientes fueron seleccionados en base a los siguientes criterios:

1. De inclusión: demostrar la infección asintomática por *Brucella canis* mediante la prueba positiva de aglutinación en placa.
2. De exclusión: no tener propietario, padecer desnutrición severa, sufrir otras enfermedades o patologías concurrentes.
3. De eliminación: suspensión del tratamiento, muerte durante el desarrollo del ensayo clínico, extravío del paciente, no tener al paciente bajo techo y cobijo, y no suplementarle la dieta prescrita.

Para cada uno de los pacientes incluidos en los ensayos, se calcularon las necesidades energéticas (en base a la fórmula $[\text{peso corporal} \times 30 + 70] \times 2$), las cuales se aportaron con alimento comercial seco granulado. Se mantuvo al perro bajo techo y cobijo las 24 horas del día mientras duró el tratamiento, permitiendo sólo salidas momentáneas para la excreción de deyecciones fecales y orina.

ES 2 353 208 T3

Para la elaboración de EDL a partir de tejido, se utilizaron bazos de perros sacrificados tal como se describe en el ejemplo no. 2. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7. A los perros incluidos en el grupo A, el EDL fue aplicado a una dosis equivalente de $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal por vía subcutánea cada 48 horas durante 30 días. Al grupo B se le aplicó un tratamiento con minociclina y estreptomicina durante tres semanas. El criterio de discriminación de éxito o fracaso del tratamiento fue negativo o positivo a la prueba de aglutinación en placa para *Brucella canis* a los 45 días posteriores al inicio del ensayo clínico.

Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Dosis de EDL*	Positividad**
A	$1,5 \times 10^6$	7,69
B	-	100
* Por kg de peso **A la prueba de aglutinación en placa expresado en porcentaje.		

Después de la evaluación de los resultados tal como se indica en el ejemplo no. 10, bajo el diseño de este ensayo clínico se puede afirmar que al utilizar EDL de origen canino no sensibilizado para el tratamiento de la brucelosis canina hay diferencia estadística altamente significativa entre los grupos de estudio A y B ($p < 0,01$).

Ejemplo 20

Tratamiento de coccidiosis canina con EDL de bazo de perro no sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo experimental, prospectivo, que describe la utilización del EDL obtenido de bazo de perros no sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de aplicación de cada 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento de coccidiosis canina. En este ensayo se utilizaron 38 perros infectados naturalmente con *Isospora canis*, que fueron diagnosticados, en un brote ocurrido en un criadero de perros pastor alemán. Se integraron dos grupos de 19 cachorros cada uno, denominados A y B. No se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas y los pacientes fueron seleccionados en base a los siguientes criterios:

1. De inclusión: presentar cuadro diarreico con evolución no mayor a siete días, demostrar la infección por *Isospora canis* mediante examen coproparasitológico, mediante técnica de flotación, edad entre 2 y 6 meses.
2. De exclusión: no tener propietario, padecer desnutrición severa, sufrir deshidratación moderada a severa, sufrir otras enfermedades o patologías concurrentes.
3. De eliminación: suspensión del tratamiento, incremento de la diarrea con deshidratación severa, muerte durante el desarrollo del ensayo clínico, no suplementarle la dieta prescrita.

Para cada uno de los pacientes incluidos en los ensayos, se calcularon las necesidades energéticas (en base a la fórmula $[\text{peso corporal} \times 30 + 70] \times 2$), las cuales se aportaron con alimento comercial seco granulado. Se mantuvo al perro bajo techo y cobijo las 24 horas del día mientras duró el tratamiento, permitiendo solo salidas momentáneas para la excreción de deyecciones fecales y orina.

Para la elaboración de EDL a partir de tejido, se utilizaron bazos de perros sacrificados tal como se describe en el ejemplo no. 2. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7. A los perros incluidos en el grupo A, se les aplicó una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal, por vía subcutánea cada 48 horas durante 10 días. Al grupo B se le aplicó un tratamiento con sulfamerazina y trimetoprim durante 10 días. Los criterios de discriminación de éxito o fracaso del tratamiento fueron negativos o positivos a la prueba en serie de tres muestras por examen coproparasitológico mediante la técnica de flotación, los días 11, 13 y 15 después del inicio del ensayo clínico.

ES 2 353 208 T3

Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Dosis de EDL*	Positividad**
A	1,5 X 10 ⁶	32
B	-	100
* Por kg de peso **A la prueba seriada expresada en porcentaje.		

Después de la evaluación de los resultados tal como se indica en el ejemplo no. 10, bajo el diseño de este ensayo clínico se puede afirmar que existen diferencias estadísticas significativas entre los grupos de estudio ($p < 0,05$) al utilizar EDL de origen canino no sensibilizado para el tratamiento de la coccidiosis canina.

Ejemplo 21

Tratamiento de leptospirosis equina con EDL de sangre de caballo sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, transversal, observacional que describe la utilización del EDL obtenido de sangre de caballos sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de aplicación de cada 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento de leptospirosis equina. En este ensayo se utilizaron 30 caballos pura sangre inglés, infectados naturalmente con *Leptospira interrogans*, que fueron detectados en la cuadra del agrupamiento ecuestre de la Policía, los cuales se numeraron por orden de positividad y se incluyeron alternativamente en los grupos A y B según el momento en que se presentaran para su atención. Con esta disposición se integraron dos grupos de 15 caballos cada uno. Los pacientes fueron seleccionados según lo descrito en el ejemplo no. 8 y no se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas. A cada uno de los pacientes incluidos en los ensayos, se le alimentó con alimento comercial seco granulado. Para la elaboración del EDL se utilizaron 15 litros sangre de tres caballos criollos adultos, clínicamente sanos, no sensibilizados provenientes de un rastro. Los extractos fueron obtenidos tal como se describe en el ejemplo no. 6. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según como se muestra en el ejemplo no. 7.

A los caballos incluidos en el grupo A se les aplicó por vía subcutánea el EDL a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 15 días. Al grupo B se le aplicó penicilina G procaínica (4.000.000/U) y estreptomicina (22 mg/kg) cada 24 horas durante 15 días.

Los signos clínicos se calificaron desde el inicio del ensayo y cada 7 días, de la siguiente manera:

- 0, cuando no hay signos.
- 1, cuando el paciente presentaba solo signos prodrómicos.
- 2, cuando los signos específicos se limitaban a vómito, diarrea, poliuria, hematuria.
- 3, cuando se observaba ictericia, hematuria, diarrea con melena, hematemesis.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 353 208 T3

Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en las siguientes tablas:

Valoración clínica del grupo A				
Caballo	Evaluación inicial	Día 7	Día 14	Día 21
1	2	1	0	0
2	2	0	0	0
3	3	1	0	0
4	2	1	1	0
5	2	1	0	0
6	3	2	1	0
7	2	1	0	0
8	2	1	1	0
9	2	2	1	0
10	2	1	0	0
11	2	1	1	0
12	2	0	0	0
13	2	0	0	0
14	3	2	0	0
15	2	2	1	0

Valoración clínica grupo B				
Caballo	Evaluación inicial	Día 7	Día 14	Día 21
1	2	2	1	0
2	2	0	0	0
3	2	1	0	0
4	3	2	0	0
5	3	1	0	0
6	2	0	0	0
7	2	1	1	0
8	2	1	1	0
9	9	1	0	0
10	2	1	0	0
11	2	2	1	0
12	2	1	0	0
13	2	1	0	0
14	2	1	0	0
15	2	2	1	0

ES 2 353 208 T3

Asimismo, para estos grupos se realizó un análisis serológico al inicio del tratamiento así como otro 21 días después para detectar anticuerpos anti-*Leptospira* mediante la técnica de microaglutinación con antígeno vivo.

Los resultados de esta prueba se muestran a continuación:

Títulos de anticuerpos anti- <i>Leptospira</i> . Grupo A			
Caballo	Título inicial	Título 21 días	Serovariedad
1	1/100	-	<i>L. australis</i>
2	1/200	-	<i>L. grippotyphosa</i>
3	1/800	-	<i>L. grippotyphosa</i>
4	1/200	-	<i>L. pomona</i>
5	1/100	-	<i>L. grippotyphosa</i>
6	1/800	1/200	<i>L. pomona</i>
7	1/100	-	<i>L. pomona</i>
8	1/200	-	<i>L. grippotyphosa</i>
9	1/100	-	<i>L. australis</i>
10	1/100	-	<i>L. australis</i>
11	1/200	-	<i>L. pomona</i>
12	1/100	-	<i>L. pomona</i>
13	1/200	1/50	<i>L. pomona</i>
14	1/400	1/50	<i>L. australis</i>
15	1/100	-	<i>L. pomona</i>

Títulos de anticuerpos anti- <i>Leptospira</i> . Grupo B			
Caballo	Título inicial	Título 21 días	Serovariedad
1	1/200	-	<i>L. australis</i>
2	1/200	-	<i>L. australis</i>
3	1/200	-	<i>L. australis</i>
4	1/400	1/100	<i>L. pomona</i>
5	1/200	-	<i>L. grippotyphosa</i>
6	1/100	-	<i>L. pomona</i>
7	1/100	-	<i>L. pomona</i>
8	1/100	-	<i>L. grippotyphosa</i>
9	1/400	1/50	<i>L. grippotyphosa</i>
10	1/100	-	<i>L. australis</i>
11	1/100	1/50	<i>L. australis</i>
12	1/100	-	<i>L. pomona</i>
13	1/100	-	<i>L. pomona</i>
14	1/200	1/50	<i>L. australis</i>
15	1/100	-	<i>L. grippotyphosa</i>

Los resultados obtenidos se sometieron a una evaluación estadística. En el caso de la valoración de los signos clínicos se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis y para el caso de la microaglutinación la prueba de t de Student. Después de la evaluación de los resultados, bajo el diseño de este ensayo clínico se puede afirmar que no hay diferencia estadística entre los grupos de estudio ($p > 0,05$) al utilizar EDL de origen equino no sensibilizado y el tratamiento con compuestos antimicrobianos. En otras palabras, ambos tratamientos resultaron igualmente eficaces contra la leptospirosis equina.

Ejemplo 22

Tratamiento de influenza equina con EDL de bazo de caballo sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, transversal, observacional que describe la utilización del EDL obtenido de bazo de caballos sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de aplicación de cada 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento de influenza equina. En este ensayo se utilizaron 20 caballos raza Appaloosa, infectados naturalmente con ortomixovirus de la influenza equina, en un brote de un criadero. Esa población equina se dividía en 4 machos y 16 hembras con edades entre dos y veinte años; con estos animales se formaron dos grupos con edades y sexos semejantes, a los cuales se les denominó grupo A y grupo B. No se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas y los pacientes fueron seleccionados en base a los siguientes criterios:

1. De inclusión: presentar signos clínicos de influenza, demostrar la infección por ortomixovirus mediante la prueba de seroneutralización.
2. De exclusión: sufrir desnutrición severa, sufrir deshidratación moderada a severa, sufrir otras enfermedades o patologías concurrentes.
3. De eliminación: suspensión del tratamiento, muerte durante el desarrollo del ensayo clínico.

A cada uno de los pacientes incluidos en los ensayos, se les alimentó con alimento comercial seco granulado y alfalfa achicalada.

Para la elaboración del EDL se utilizaron tres bazos de caballos criollos, adultos, clínicamente sanos, no sensibilizados, provenientes de un rastro. Los extractos fueron obtenidos tal como se describe en el ejemplo no. 2. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, tal como se muestra en el ejemplo no. 7.

A los caballos incluidos en el grupo A se les aplicó por vía subcutánea el EDL a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 15 días. Al grupo B se le aplicó solución salina fisiológica por la misma vía y a un volumen equivalente al utilizado para el EDL.

El criterio de éxito en el tratamiento consistió en la desaparición clínica de todos los signos indicativos de sufrir influenza equina. El criterio de fracaso fue el de la persistencia de tan solo un signo clínico de la enfermedad. Se realizaron dos valoraciones clínicas de los grupos en estudio, el primero a los siete días del inicio y otro a los 15 días.

Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Dosis de EDL*	Recuperación clínica**	Morbilidad	Recuperación clínica**	Morbilidad
		Primera semana		Segunda semana	
A	$1,5 \times 10^8$	100	0	100	0
B	-	10	90	50	50
* Por kg de peso **Desaparición de signos, expresado en porcentaje.					

Después de la evaluación de los resultados tal como se indica en el ejemplo no. 10, bajo el diseño de este ensayo clínico, se puede afirmar que existen diferencias estadísticas significativas a favor del grupo de caballos tratados con EDL ($p < 0,05$) con respecto al grupo no tratado, al utilizar EDL de origen equino no sensibilizado para el tratamiento de influenza equina.

Ejemplo 23

Tratamiento de enfermedad de Aujeszky porcina con EDL de sangre de cerdo sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, transversal, observacional que describe la utilización del EDL obtenido de sangre de cerdos sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de aplicación de cada 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento de la enfermedad de Aujeszky en cerdos. En este ensayo se utilizaron 20 lechones raza Landrace de 6 semanas de edad, libres de anticuerpos específicos contra la enfermedad de Aujeszky. Después de tres días de aclimatación, en jaulas cerradas (no a la intemperie) colectivas con pavimento de cemento y muros de tabique, a temperaturas promedio de 20°C y humedad relativa de 40 a 50%, los animales fueron agrupados en dos grupos de 15 lechones cada uno, los cuales fueron denominados grupo A y grupo B. No se consideró la raza, edad, sexo, ni vacunaciones previas y los pacientes fueron seleccionados en base a los siguientes criterios:

1. De inclusión: estar clínicamente sano, no presentar anticuerpos contra la enfermedad de Aujeszky.
2. De exclusión: sufrir desnutrición, sufrir otras enfermedades o patologías concurrentes.
3. De eliminación: suspensión del tratamiento, muerte por otra causa diferente a la infección por Aujeszky.

Todos los cerdos que reunieron los criterios de inclusión en este ensayo fueron inoculados por vía intranasal con 3 ml de virus de desafío cepa Becker del virus de Aujeszky (10^7 DICC50%/ml), la cual se propagó y tituló en células de riñón de bovino (MDBK), utilizando como medio esencial mínimo adicionado con el 10% de suero fetal bovino. A los cinco días después de la inoculación y cada vez que se presentaron los signos indicativos de infección respiratoria y viremia (rinorrea, epifora, estornudos, tos, depresión y fiebre), se les administró EDL. Para la elaboración del EDL se utilizaron 15 litros de sangre de cerdos sanos vacunados contra la enfermedad de Aujeszky con vacuna de virus activo modificado de la cepa Bartha. Los extractos fueron obtenidos según se describe en el ejemplo no. 5. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7.

El grupo A fue tratado con EDL a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal con intervalos de aplicación de cada 48 horas por vía intramuscular durante 10 días; el grupo B recibió exclusivamente solución salina fisiológica en volúmenes semejantes a los del EDL del grupo A.

Los signos clínicos se calificaron desde el inicio del ensayo y cada 24 hrs, de la siguiente manera:

- 0 cuando no hay signos.
- 1 cuando el paciente presentó solo signos prodrómicos (fiebre, depresión mental, anorexia).
- 2 cuando los signos específicos se limitaron a epifora, rinorrea, estornudo, tos, taquipnea.
- 3 cuando se observó ataxia, parálisis, convulsiones, postración estuporosa y muerte.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 353 208 T3

Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Severidad de los signos clínicos por día. Grupo A. Dosis de EDL*										
1,5 X 10 ⁶										
	Día									
Lechón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	1	1	2	2	2	0	0	0	0
2	1	1	1	2	2	1	0	0	0	0
3	1	1	1	2	2	2	1	0	0	0
4	0	1	2	2	2	1	0	0	0	0
5	1	1	1	2	2	1	0	0	0	0
6	0	1	1	2	2	1	0	0	0	0
7	1	1	2	2	2	1	0	0	0	0
8	0	1	1	2	2	1	0	0	0	0
9	0	1	1	2	2	1	0	0	0	0
10	0	1	1	2	2	2	1	0	0	0
* Por kg de peso										

Severidad de los signos clínicos por día. Grupo B. Sin Dosis de EDL										
Día										
Lechón	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3
2	0	1	2	2	2	2	3	3	3	3
3	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3
4	0	1	1	2	2	2	3	3	3	3
5	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3
6	1	1	1	1	2	2	2	2	3	3
7	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
8	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3
9	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3
10	0	1	1	2	2	2	3	3	3	3

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. El diseño de este ensayo clínico permite afirmar que sí hay diferencias estadísticas significativas a favor del grupo A con respecto al B ($p \leq 0,01$), al utilizar EDL de origen sanguíneo porcino sensibilizado para el tratamiento de la enfermedad de Aujeszky.

ES 2 353 208 T3

Ejemplo 24

Tratamiento de la rinitis atrófica porcina con EDL de bazo de cerdo sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico prospectivo, transversal, observacional que describe la utilización del EDL obtenido de bazo de cerdos sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ por kg de peso con intervalos de aplicación de cada 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento de la rinitis atrófica en cerdos. En este ensayo se utilizaron 30 cerdos raza Duroc, infectados naturalmente con *Bordetella bronchiseptica* y *Pasterella multocida* tipo D toxigénica, que fueron muestreados en una granja de ciclo completo. Con dichos pacientes se integraron dos grupos de 15 cerdos cada uno. No se tomó en consideración la edad, el sexo, ni las vacunaciones previas. Para que un cerdo pudiera ser considerado como candidato a ingresar a este ensayo clínico debió cumplir con los siguientes criterios:

1. De inclusión: presentar signos clínicos de infección por *Bordetella bronchiseptica* y *Pasterella multocida* tipo D toxigénica, demostrar la infección por *Bordetella bronchiseptica* y *Pasterella multocida* tipo D toxigénica, a las 10 semanas de edad, mediante aislamiento bacteriano.
2. De exclusión: sufrir desnutrición severa, sufrir deshidratación moderada a severa, sufrir otras enfermedades o patologías concurrentes.
3. De eliminación: suspensión del tratamiento, muerte durante el desarrollo del ensayo clínico.

A todos los cerdos que se les aplicaron los criterios de inclusión y exclusión en este ensayo se les alimentó con alimento comercial seco granulado.

Para la elaboración del EDL se utilizaron 20 litros de sangre de 5 cerdos sensibilizados en dos ocasiones, 30 y 15 días antes, con toxoide comercial contra *Bordetella bronchiseptica* y *Pasterella multocida* tipo D toxigénica (Atrobac, Lab. Pfizer). Los extractos fueron obtenidos según se describe en el ejemplo no. 5. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7.

A los cerdos incluidos en el grupo A se les aplicó por vía intramuscular el EDL a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 15 días, iniciando su aplicación a las 12 semanas de vida. Al grupo B se le aplicó solución salina fisiológica con el mismo volumen y a la misma frecuencia. A las 24 semanas los cerdos fueron sacrificados y se evaluó el grado de braquignatia y los grados de rinitis atrófica según las técnicas descritas por Done.³⁵

Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en la siguiente tabla:

Grupo	Dosis de EDL*	Branquignatia**	Rinitis**
A	$1,5 \times 10^6$	$1,112 \pm 0,398$	$1,155 \pm 0,802$
B	-	$1,498 \pm 0,534$	$2,324 \pm 1,483$
* Por kg de peso ** Considerando la media y su desviación estándar.			

Después de la evaluación de los resultados, bajo el diseño de este ensayo clínico se puede afirmar que no hay diferencia estadística en la dimensión de la braquignatia entre los grupos de estudio ($p > 0,01$) al utilizar EDL de origen porcino no sensibilizado y el control. En cambio, sí se observaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) al valorar los grados de rinitis, a favor del grupo de cerdos tratados con EDL de origen sanguíneo porcino sensibilizado comparado con los cerdos sin tratamiento.

Ejemplo 25

Tratamiento de neumonía porcina con EDL de bazo de cerdo sensibilizado

Este ejemplo corresponde a un ensayo clínico, prospectivo, transversal, observacional que describe la utilización del EDL obtenido de bazo de cerdos sensibilizados a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso con intervalos de aplicación de cada 48 horas por vía subcutánea para el tratamiento de neumonía por Micoplasmosis complicada en cerdos. En este ensayo se utilizaron 30 cerdos raza Landrace, infectados naturalmente con *Mycoplasma*

ES 2 353 208 T3

hyopneumoniae y *Pasterella multocida* tipo D toxigénica, en un brote agudo de enfermedad respiratoria en una granja de ciclo completo, en la cual se diagnosticó micobacteriosis por lesiones anatomopatológicas y pausterelosis por cultivo microbiológico. Con los 30 cerdos se integraron dos grupos de 15 cerdos cada uno con edades entre 4 y 12 semanas de edad. No se tomó en consideración, el sexo, ni las vacunaciones previas. Para que un cerdo pudiera ser considerado como candidato a ingresar a este ensayo clínico debió cumplir con los siguientes criterios:

1. De inclusión: presentar signos clínicos de infección respiratoria, estar alojado en un corral en donde de haya muerto otro cerdo con diagnóstico anatomopatológico de *Mycoplasma hyopneumoniae* y microbiológico de *Pasterella multocida*, tener entre 4 y 12 semanas de edad, no presentar más de 7 días con signos de enfermedad respiratoria.
2. De exclusión: sufrir desnutrición severa, sufrir deshidratación moderada a severa, sufrir otras enfermedades o patologías concurrentes.
3. De eliminación: suspensión del tratamiento, muerte durante el desarrollo del ensayo clínico.

A todos los cerdos que se les aplicaron los criterios de inclusión y exclusión en este ensayo se les alimentó con alimento comercial seco granulado, para la etapa de crecimiento.

Para la elaboración del EDL se utilizaron 10 bazos de cerdos sensibilizados con bacterina contra *Mycoplasma hyopneumoniae* y toxoide comercial contra *Bordetella bronchiseptica* y *Pasterella multocida* tipo D toxigénica (Atro-bac, Lab. Pfizer). El tejido linfoide se obtuvo de un rastro local. Los extractos fueron obtenidos según se describe en el ejemplo no. 2. Después de obtenidos los extractos, éstos se estandarizaron a una concentración equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por dosis, según se muestra en el ejemplo no. 7.

A los cerdos incluidos en el grupo A se les aplicó EDL por vía intramuscular a una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por kg de peso corporal cada 48 horas durante 10 días. Al grupo B se les aplicó solución salina fisiológica con el mismo volumen y a la misma frecuencia que el EDL del grupo A.

Los signos clínicos se calificaron, en ambos grupos, desde el inicio del ensayo y cada 24 horas durante los siguientes 10 días, de la siguiente manera:

- 0 cuando no hay signos.
- 1 cuando el paciente presentaba ligera depresión mental, anorexia.
- 2 cuando los signos específicos se limitaban a estornudo, tos seca, diarrea.
- 3 cuando se observaba taquipnea, cianosis, postración estuporosa y muerte.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 353 208 T3

Los resultados obtenidos, después del tratamiento, se muestran en las siguientes tablas:

Severidad de los signos clínicos por día. Grupo A. Dosis de EDL* 1,5 X 10 ⁶										
	Día									
Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
3	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1
4	2	2	2	2	2	2	1	1	0	0
5	1	2	2	2	1	1	0	0	0	0
6	1	1	1	2	2	1	0	0	0	0
7	1	2	2	2	2	2	1	1	1	0
8	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
9	1	1	1	2	1	0	0	0	0	0
10	2	2	2	2	2	1	1	1	0	0
11	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
12	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
13	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
14	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
15	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
* Por kg de peso										

Severidad de los signos clínicos por día. Grupo B. Sin dosis de EDL										
	Día									
Cerdo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	3
3	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
4	1	1	1	2	2	2	1	2	2	3
5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3
7	1	1	2	2	2	2	3	3	3	3
8	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3
9	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2
10	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3
11	2	2	2	2	2	2	2	3	3	3
12	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2
14	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
15	1	1	1	1	2	2	2	2	2	3
* Por kg de peso										

Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis. Después de la evaluación de los resultados, bajo el diseño de este ensayo clínico se puede afirmar que sí hay diferencias estadísticas a favor del grupo A con respecto al B ($p \leq 0,05$), al utilizar EDL de origen sanguíneo porcino sensibilizado para el tratamiento de la enfermedad respiratoria por micoplasmosis y pasteurelosis porcina.

Referencias

1. **Spinelli, SJ.** 1986. *Farmacología Veterinaria y Terapéutica*. México: Interamericana.
2. **Apple MJ.** 1998. *La Consulta Veterinaria en 5 Minutos*. Buenos Aires: Inter-Médica.
3. **Thompson H.** 1998. *Canine Medicine and Therapeutics*. Oxford: Blackwell Science.
4. **Sherding RG.** 1996. *Manual Clínico de Pequeñas Especies*. México: Interamericana.
5. **Greene CE** 1993. *Enfermedades Infecciosas, Perros y Gatos*. México: Interamericana.
6. **Davenport DJ.** 1993. *Pediatría Veterinaria, Perros y Gatos*. México: Interamericana.
7. **Swango LJ.** 1995. *Textbook of Veterinary Internal Medicine, Diseases of the Dog and Cat*. Philadelphia: W.B. Saunders.
8. **Lawrence, H.S.** 1949. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 71: 516-522.
9. **Lawrence, H.S.** 1955. *J. Clin. Inv.* 34: 219-230.
10. **Levin, A.S.** 1970. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 67: 821-828.
11. **Ferrer Argote, V.E.** 1995. *Rev. Med. Hospital General de México, S.S.* 58: 148-150.
12. Patente de Estados Unidos 4,435,384.
13. **Wolf, R.E.** 1978. *Clin. Immunol Immunopathol* 10: 292-297.
14. **Steele.** 1980. *New Engl. J. Med.* 303: 355-359.
15. **Louie.** 1987. *Clin. Immunol Immunopath* 44: 329-334.
16. **McMeeking.** 1990. *J. Infect. Dis.* 161: 108-112.
17. **Estrada Parra, S.** 1983. *Salud Pública de México.* 6: 579-590.
18. **Kirkpatrick, C.H.** 1979. *Immune Regulators in Transfer Factor*. Academic. Press. New York.
19. **Delgado, O.** 1981. *Clin. Immunol Immunopathol.* 19: 351-359.
20. **Mikula, I.** 1992. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 32: 113-124.
21. **Kirkpatrick, C.H.** 1993. *Annal New York Acad Sci.* 362: 368.
22. **Klesius, P.H.** 1978. *Clin. Immunol Immunopathol.* 10: 214-221.
23. **Littman, B.H.** 1978. *Clin. Immunol Immunopathol.* 9: 97-110.
24. **Klesius, P.H.** 1984. *Poultry Sci.* 63: 1333-1337.
25. **Lawrence, H.S.** 1960. *Ciba Foundat on Symposium on Cellular Aspects of Immunity* (Boston: Little Brown). 243.
26. **Lawrence, H.S.** 1966. *Trans. Ass. Amer. Physicians.* 76: 84.
27. **Baram, P.** 1966. *J. Immunol.* 97: 407.
28. **Haddad, Z.H.** 1968. *J. Allergy.* 41:112.
29. **Khan, A.** 1980. *Cell. Immunol.*, 55: 420.

ES 2 353 208 T3

30. **Gottlieb**, A..A. 1982. *Clin. Exp. Immunol.*, 50: 434.
31. **Wilson**, G.B., *et. al.* 1977. *Clin Immunol Immunopathol*, 8: 551.
- 5 32. **Kirkpatrick**, C.H. 1999. US Pat 5,883,224.
33. **Mikula**, I. 1992. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 32: 103-112.
34. **Fudenberg**, H.H. 1989. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 475-516.
- 10 35. **Done**, J.T. 1980. *Vet. Annual* 15: 1-7.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Extracto dializado de leucocitos estéril, libre de células completas o viables y que contiene moléculas menores de 12 KDal de peso, **caracterizado** porque es estable en solución a 4°C durante 7 a 12 meses sin el uso de conservantes y en el que el extracto dializado se esteriliza mediante adición de ozono.
2. Extracto, según la reivindicación 1, **caracterizado** porque contiene una concentración equivalente de leucocitos de 1×10^5 a 5×10^9 por ml.
3. Extracto, según la reivindicación 1 ó 2, **caracterizado** porque los leucocitos provienen de sangre o tejido linfático de animales.
4. Extracto, según la reivindicación 3, **caracterizado** porque el tejido linfático es seleccionado de timo, nódulos linfáticos, bazo o combinaciones de los mismos.
5. Extracto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque es preparado a partir de tejidos de animales previamente sensibilizados contra un agente etiológico infeccioso específico.
6. Extracto, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, **caracterizado** porque es preparado a partir de tejidos de animales no sensibilizados contra un agente etiológico infeccioso específico.
7. Composición farmacéutica, **caracterizada** porque comprende una cantidad terapéuticamente efectiva del extracto dializado de leucocitos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en un vehículo farmacéuticamente aceptable.
8. Composición farmacéutica, según la reivindicación 7, **caracterizada** porque el extracto dializado de leucocitos se encuentra en una concentración equivalente de leucocitos de 1×10^5 a 5×10^9 por ml.
9. Composición farmacéutica, según la reivindicación 7 u 8, **caracterizada** porque contiene adicionalmente un antibiótico.
10. Composición farmacéutica, según la reivindicación 9, **caracterizada** porque el antibiótico es seleccionado del grupo que comprende sulfamerazina, trimetopina, minociclina, amoxicilina, gentamicina, penicilina y estreptomicina.
11. Kit terapéutico para el tratamiento de un animal no humano afectado de una enfermedad infecciosa, **caracterizado** porque comprende 6 a 10 dosis individuales de la composición farmacéutica, según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que de 30% a 50% de dichas dosis individuales son de 3 a 300 veces mayores en la concentración del extracto dializado de leucocitos que el resto de las dosis.
12. Método para obtener el extracto dializado de leucocitos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende los pasos de:
 - Recolectar los tejidos celulares que contienen los leucocitos de un donante animal no humano,
 - Separar los leucocitos de los tejidos celulares obtenidos en a),
 - Lisar los leucocitos obtenidos en b),
 - Dializar el extracto obtenido en el paso c),**caracterizado** porque el extracto dializado obtenido en el paso d) es esterilizado por la adición de ozono a una concentración de 0,2 a 0,5 ppm aplicado por burbujeo.
13. Método, según la reivindicación 12, **caracterizado** porque el ozono es adicionado a una concentración de 0,3 ppm.
14. Uso del extracto dializado de leucocitos, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la manufactura de un medicamento para el tratamiento de un animal vertebrado no-humano con una infección causada por un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en bacterias, hongos, protozoarios y virus, que incluye administrar al animal no-humano infectado una cantidad terapéuticamente efectiva del extracto.
15. Uso, según la reivindicación 14, **caracterizado** porque el extracto dializado de leucocitos es administrado con una dosis equivalente a 1×10^6 a 5×10^6 leucocitos por Kg de peso corporal.
16. Uso, según la reivindicación 15, **caracterizado** porque el extracto dializado de leucocitos es administrado con una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por Kg de peso corporal.

17. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, **caracterizado** porque el extracto dializado de leucocitos es aplicado a un intervalo entre dosis de 8 horas a 30 días.
18. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, **caracterizado** porque el extracto dializado de leucocitos es administrado vía parenteral o enteral.
19. Uso, según la reivindicación 18, **caracterizado** porque el extracto de dializado de leucocitos es administrado vía subcutánea.
20. Uso, según cualquiera de las reivindicaciones 14 a 19, **caracterizado** porque el extracto dializado de leucocitos es aplicado en una única dosis.
21. Uso, según la reivindicación 14, en el que el animal vertebrado no-humano es un mamífero o un ave.
22. Uso, según la reivindicación 21, en el que el mamífero es seleccionado del grupo que consiste en felinos, caninos, porcinos, equinos, bovinos y ovinos.
23. Uso, según la reivindicación 21, en el que el microorganismo es un virus seleccionado entre virus de herpes α , virus de herpes β , virus de herpes γ , Morbilivirus, pneumovirus, coronavirus, papilomavirus, oncornavirus, ortomixovirus, paramixovirus, lentivirus y oncovirus; o en el que el microorganismo es una bacteria seleccionada entre *Pasteurella*, *Mycoplasma*, *Mycobacterium*, *Leptospira*, *Brucella*, *Bordetella*, *Haemophilus*, *Treponema* y *Campylobacter*; o en el que el microorganismo es un hongo seleccionado de *Actinomyces*, *Coccidioidomycosis*, *Histoplasma*, *Cryptococcus*, *Blastomyces*, *Aspergillus* y *Candida*; o en el que el microorganismo es un protozooario seleccionado de *Leishmania*, *Entamoeba*, *Toxoplasma*, *Isospora*, *Ehrlichia*, *Neospora*, *Cryptosporidium* y *Balantidium*.
24. Uso, según la reivindicación 21, en el que la infección causada por virus es seleccionada de rinotraqueitis bovina infecciosa, mamilitis ulcerativa, fiebre catarral maligna, influenza, peste bovina, parainfluenza-3, virus bovino sincicial, diarrea neonatal del carnero, papilomatosis, leucosis bovina, rinoneumonitis equina, exantema coital equina, anemia infecciosa equina, parainfluenza SV-5, herpesvirus canino, Rinotraqueitis felina, urolitiasis felina, peritonitis infecciosa felina, leucemia viral felina, herpes virus del cerdo lactante, rinitis atrófica, gastroenteritis transmisible, encefalomielitis hemoaglutinante, enfermedad del ojo azul, adenomatosis pulmonar, laringotraqueitis infecciosa, enfermedad de Marek, plaga de aves, enfermedad de Newcastle, bronquitis infecciosa y leucosis aviar; o en el que la infección causada por bacterias se selecciona de septicemia hemorrágica, pleuroneumonía contagiosa, mastitis bovina, paratuberculosis, tuberculosis, leptospirosis, brucelosis, neumonía enzoótica porcina, disentería porcina, campilobacteriosis, enfermedad respiratoria crónica, sinovitis infecciosa y cólera aviar; o en el que la infección causada por hongos se selecciona de actinomicosis, coccidiomicosis, histoplasmosis, criptococosis, blastomicosis, aspergilosis y candidiasis; o en el que la infección causada por protozoarios se selecciona de toxoplasmosis, leishmaniasis, balantidiasis, amibiasis, coccidiosis, erliquiosis y neosporosis.
25. Uso, según la reivindicación 21, en el que el extracto es preparado a partir de tejidos de un animal no humano de la misma especie o de otra especie diferente que el animal no humano que recibe el tratamiento.
26. Uso, según la reivindicación 14, **caracterizado** porque la infección causada por virus es seleccionada del grupo que consiste en moquillo canino y enfermedad de Aujeszky.
27. Uso, según la reivindicación 26, **caracterizado** porque el extracto dializado de leucocitos es administrado con una dosis equivalente a 1×10^5 a 5×10^9 leucocitos por Kg de peso corporal; o porque el extracto dializado de leucocitos es administrado con una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por Kg de peso corporal.
28. Extracto dializado estéril, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para ser usado en el tratamiento de un animal vertebrado no-humano con una infección causada por un microorganismo seleccionado del grupo que comprende bacterias, hongos, protozoarios y virus, que incluye administrar al animal no-humano infectado una cantidad terapéuticamente efectiva del extracto.
29. Extracto dializado estéril para ser usado de acuerdo a la reivindicación 28, **caracterizado** porque el extracto es administrado con una dosis equivalente a 1×10^6 a 5×10^6 leucocitos por Kg de peso corporal; o porque el extracto es administrado con una dosis equivalente a $1,5 \times 10^6$ leucocitos por Kg de peso corporal.
30. Extracto dializado estéril para ser usado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 29 para el tratamiento de un animal vertebrado no-humano con una infección causada por un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en moquillo canino y enfermedad de Aujeszky.
31. Extracto dializado de leucocitos estéril, libre de células completas o viables que contienen moléculas menores a 12 KDal de peso para usarse en el tratamiento de un animal vertebrado no-humano con una infección causada por un microorganismo seleccionado del grupo que consiste en moquillo canino y enfermedad de Aujeszky.