



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 914**

51 Int. Cl.:
G01N 33/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Número de solicitud europea: **01303685 .0**
86 Fecha de presentación : **23.04.2001**
87 Número de publicación de la solicitud: **1156333**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **21.11.2001**

54 Título: **Procedimiento para medir la duración de la memoria inmune adecuada en animales de compañía.**

30 Prioridad: **27.04.2000 US 200041 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.02.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.02.2008

73 Titular/es: **Pfizer Products Inc.**
Eastern Point Road
Groton, Connecticut 06340, US

72 Inventor/es: **Coyne, Michael Joseph;**
Kowalski, Dennis Joseph;
McGavin, David Ross y
O'Hara, Michael Kenneth

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Procedimiento para medir la duración de la memoria inmune adecuada en animales de compañía.

5 Antecedentes de la invención

La finalidad de una vacuna es de carácter doble: proteger al individuo de la enfermedad y mantener un número suficientemente grande de individuos inmunes en la población, de forma que la enfermedad no se transmita fácilmente. En la medida en que haya un riesgo de infección, se requiere un nivel umbral de individuos inmunes para mantener la inmunidad de un conjunto de animales. Si el número de individuos inmunes en la población disminuye por debajo de este umbral, debido a una mengua de la protección de la vacuna o a una ausencia de vacunación, se pueden producir focos de la enfermedad. Por tanto, un parámetro importante de una vacuna es el tiempo que sea capaz de proteger al animal de una infección.

Actualmente, como hay disponible poca o ninguna información sobre la duración de la inmunidad para la mayoría de las vacunas para animales, se recomienda una vacuna anual para mayoría de las etiquetas de vacunas y veterinarios (Schultz R.D. *Veterinary Medicine* 93:233-254 (1998)). Estas recomendaciones de la administración anual de vacunas ya fueron hechas en 1961, y desde entonces ha sido establecida como la práctica estándar por las organizaciones veterinarias. Pero la información reciente sugiere que muchas vacunas proporcionan una inmunidad eficaz en animales de compañía durante años; por lo tanto, la administración anual de vacunas puede no ser necesaria (Macy D.W. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207:421-425 (1995)).

Hasta recientemente, la mayoría de las vacunas fueron evaluadas en cuanto a la duración de la inmunidad solamente durante unas pocas semanas o meses, pero no necesariamente el intervalo de vacunación completo indicado en la etiqueta. Recientemente, las normas de la entidad USDA han sido ampliadas para requerir que las nuevas vacunas veterinarias aprobadas como nuevas se muestre que inducen la duración mínima de la inmunidad establecida en la etiqueta del producto, pero no se requiere que los fabricantes establezcan una duración máxima de la inmunidad proporcionada por la vacuna. (Informe de 1998 de la entidad "American Association of Feline Practitioners" y "Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Vaccines" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 227-241 (1998)).

En general, se considera que los riesgos de efectos secundarios para animales está compensado por la ventaja conferida por la administración anual de la vacuna, incluso aunque la mayoría de las vacunas carecen de datos experimentales de apoyo que documenten la necesidad de una administración anual de la vacuna (Informe de 1988 de la entidad "American Association of Feline Practitioners" y "Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Vaccines" *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212, 227-241 (1998)). Pero en la actualidad, la incidencia de efectos secundarios graves de las vacunas en animales es más evidente y la relación de riesgo/ventajas para una administración anual de vacunas ya no resulta favorable (Smith *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 207, 421-425 (1995); Hendrick *et al.* *Cancer Research* 52, 5391-5394 (1992); Duval *et al.* *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10, 290-295 (1996)). Las respuestas adversas varían en la gama desde reacciones locales menores y picores hasta anafilaxis grave y a veces fatal o desarrollo de neoplasia. A corto plazo, un animal no se aprovecha y puede ser situado en un riesgo grave cuando es vacunado innecesariamente (W. Jean Dodds In *Advances in Veterinary Medicine*, Vol. 41, *Veterinary Vaccines and Diagnostics*, Ronald D. Schultz ed. pág. 718-719 (1999)). No obstante, la comunidad de los animales de compañía, debido a la falta de una información suficiente sobre la duración de la inmunidad, a conciliado el riesgo de una sobre-vacunación con la ventaja proporcionada por las vacunas en evitar una enfermedad grave en animales. Pero este argumento resulta menos convincente considerando las vacunas más recientes para enfermedades que no se producen con una frecuencia elevada en animales sin vacunar o que son las menos graves (por ejemplo, enfermedad de Lyme, leucemia felina, peritonitis infecciosa felina y sarna).

Convencionalmente, la duración de la inmunidad ha sido establecida seleccionando un número apropiado de animales desprovistos de sistema inmunológico (por ejemplo, 20-100), vacunando con una dosis mínima inmunizante de la vacuna experimental o placebo, manteniendo los animales en un aislamiento estricto durante el período deseado y estimulado seguidamente con el organismo virulento. La enfermedad clínica observada en los vacunados es comparada con la de los no vacunados. Una desventaja de esta aproximación es que no es del "mundo real" es decir, la estimulación normalmente no es hecha con las cepas actualmente en circulación del agente infeccioso en cuestión, ni a través de la vía o medio inherente en el ajuste del sector. Además de ello, estos estudios, sin necesidad, son largos, requieren trabajo y son costos, además de que a menudo son destructivos para los animales. Debe ser reconocido también que cuanto más largo sea el período de estudio, mayor es el riesgo de que los animales del estudio puedan ser inadvertidamente expuestos al agente patógeno que es el sujeto del estudio, invalidando así el estudio. Estos factores son consideraciones principales cuando las empresas farmacéuticas establecen la duración de los estudios de inmunidad.

En general, la respuesta del sistema inmune de un animal a una infección o inmunización puede ser dividida en dos categorías funcionales: inmunidad humoral e inmunidad celular. La inmunidad humoral incluye células de plasma (células B activadas) y células B de memoria. Durante una respuesta inmune humoral, los anticuerpos específicos para antígenos generados por células de plasma neutralizan u ozonizan agentes infecciosos extracelulares y/o factores de virulencia. La inmunidad humoral es importante para una protección contra fases extracelulares de una infección sistémica viral y bacteriana.

La inmunidad celular incluye la producción de células T efectoras, células T de memoria (CD4⁺T y CD8⁺T) y células NK que son responsables de la destrucción directa (célula a célula) o indirecta (a través de citoquinas) de las células infectadas (Wood PR *et al.* Veterinary Immunology & Immunopathology 54:33-44 (1996) y Allen JE *et al.* Immunology Today 18:387-392 (1997)). La inmunidad celular es importante en la lucha contra agentes patógenos intracelulares.

Además de la inmunidad humoral y celular, el sistema inmune no específico (es decir, células fagocíticas) ayuda al control inicial de la infección, pero no se ve afectado por la vacuna o por una exposición anterior.

El sistema inmune realiza una autorregulación entre una respuesta inmune humoral y celular, de forma que a continuación de una infección o indización, predomina una de ellas. El tipo de respuesta que predomina está relacionado con el tipo de agente infeccioso, la vía de infección, la patogénesis del agente (local frente a sistémica) y, en el caso de vacunas inactivadas, el agente inactivante y el tipo de adyuvante usado.

Es evidente que algunas células de plasma deben persistir durante períodos de tiempo prolongados, ya que los títulos de anticuerpos pueden persistir en la sangre durante años después de una infección o vacuna sin nueva exposición. La presencia de estos anticuerpos neutralizantes u oxonizantes sistémicos previamente existentes en el lugar de infección es eficaz para prevenir la infección y proporcionar una inmunidad protectora durante muchos años (Plotkin SA & Mortimer EA. Eds., 1994. Vaccines. Second Edition, WE Saunders, Philadelphia).

Pueden ser usados procedimientos basados en ensayos (en lugar de una estimulación patógena con el agente infeccioso virulento) como una indicación de la presencia de una memoria inmune o inmunidad protectora adecuadas (Olson *et al.* Am. J. Vet. Res. 49, 1460-1466 (1988), Sprent *et al.* Science 265, 1395-1400 (1994), Alderink *et al.* Am. J. Vet. Res. 207, 1016-1018 (1995) Schultz (1995), Smith Am. J. Vet. Res. 207, 421-425 (1995)). Para muchas enfermedades, una memoria inmune adecuada puede ser verificada detectando una rápida respuesta del sistema inmune (es decir, una respuesta anamnésica) inducida por la exposición a un antígeno específico, por ejemplo, la detección de anticuerpos en suero o la cuantificación serológica de anticuerpos formados en respuesta a la administración de la vacuna (Alderink *et al.* J. Am. Vet. Med. Assoc. 207, 1016-1018 (1995); Dodds Proc. Am. Holistic Vet. Med. Assoc. 74-80 (1995); Dodds Vaccine Related issues in Complementary and Alternative Veterinary Medicine, A.M. Schoen and S.G. Wynn, eds. pág. 701-702 (1997); Schultz (1995); Scott *et al.* Feline Pract. 25, 12-19 (1997)).

Pero la inmunidad contra agentes infecciosos para los que una respuesta celular es el modo principal de protección, puede no estar correlacionada con los niveles de anticuerpos. En estos casos, una memoria inmune adecuada puede ser determinada mediante un inmunoensayo celular. Por ejemplo, con el virus de la rinotraqueitis felina (Johnson *et al.* Journal of the American Veterinary Medical Association 186, 149-152 (1985)) y el virus de la peritonitis infecciosa felina (Pedersen Feline Practice 23, 7-20 (1995)), que están contrarrestados en los animales de compañía principalmente por una respuesta inmune celular, no hay ninguna correlación del nivel de anticuerpos con la protección. Existe una mayor correlación con los niveles de anticuerpos para la protección contra el virus de la leucemia felina (Haffer *et al.* Vaccine 8, 12-16 (1990)), pero están involucradas la inmunidad tanto celular como humoral. Y existe una fuerte correlación cuando es necesaria la inmunidad humoral sola para la protección, por ejemplo, contra *Leptospira canicola* (Hartman *et al.* Veterinary Immunology and Immunopathology 7, 245-254 (1984)).

Deben ser considerados otros factores cuando se escoge un procedimiento basado en ensayos para determinar una memoria inmunológica. Por ejemplo, con enfermedades que replican y provocan un deterioro principalmente en las superficies mucosales, por ejemplo, *Bordetella bronchiseptica*, coronavirus canino, parainfluenza canina y *Chlamydia psittaci*, los datos serológicos pueden no estar extensivamente correlacionados con la protección (Tennant *et al.* Research in Veterinary Science 51, 11-18 (1991); Bey *et al.* American Journal of Veterinary Research 42, 1130-1132 (1981); y Mitzel *et al.* American Journal of Veterinary Research 38, 1361-1363 (1977)). Esto es porque la mayoría de las clases de anticuerpos responsables de la inmunidad humoral sistémica, así como los glóbulos blancos responsables de la inmunidad mediada por células, no están presentes en la superficie mucosal, y un suero sanguíneo basado en una respuesta inmune generalmente no es suficientemente rápido para proporcionar un anticuerpo protector o niveles de glóbulos blancos a la capa mucosal. Sin embargo, una respuesta inmune basada en suero, disminuirá en la mayoría de los casos la gravedad de enfermedades mucosalmente basadas.

Aunque los datos serológicos son útiles para proporcionar una evidencia de una memoria inmunológica contra un agente patógeno particular, la evaluación cuantitativa generalmente no es informativa porque las metodologías de los ensayos y los niveles de títulos no han sido estandarizados entre los procedimientos o laboratorios de los ensayos (Luff *et al.* Vet. Rec. 120, 270-273 (1987)). El uso de diferentes ensayos no solamente provocará una variación, sino que incluso, cuando son usados los mismos ensayos, los valores numéricos dependerán de los conocimientos del técnico, de la técnica y la instalación.

En conclusión, aunque existen procedimientos para determinar si un animal tiene un marcador o una inmunidad, no existe ninguna metodología práctica para determinar la duración de la inmunidad para vacunas de animales. Este objetivo se cumple ahora mediante el procedimiento de la presente invención, como se describe a continuación.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona una metodología eficaz para medir la duración de una memoria inmune adecuada para vacunas de animales. La invención incluye análisis retrospectivos utilizando los historiales de administración de vacunas veterinarias y los historiales clínicos, y los marcadores de inmunidad de animales en el sector (en lugar en el laboratorio) para deducir a una duración de las vacunas con una memoria inmune adecuada. La vacuna puede ser cualquier vacuna conocida o que vaya a ser desarrollada y puede ser una vacuna de componente único o puede comprender más de un componente inmunogénico.

Según la actual invención, como la estimulación se produce en el sector bajo condiciones naturales, las variables medioambientales (temperatura, humedad, interior/exterior), fisiológicas (nutrición, ejercicio) y psicológicas (estrés del estilo de vida o ambiente acogedor del conjunto familiar) inherentes en el conjunto del sector son incorporadas en la valoración de la vacuna. Esto está en contraste con los estudios de estimulaciones tradicionales que usan una única cepa de laboratorio del agente infeccioso, que pueden ser o no ser actuales con respecto a la situación epidemiológica del sector. Por tanto, en el mantenimiento y la estimulación tradicionales en una aproximación de confinamiento, es menos probable que estas variables sean representativas de la situación del mundo real y, por tanto, la duración medida en laboratorio de la inmunidad puede no corresponderse con una duración de la inmunidad en el sector.

En una realización, la invención se refiere a un procedimiento para determinar una duración de una memoria inmune adecuada inducida por una vacuna, para una enfermedad, en un animal, en el que el animal es un perro o un gato, en que el procedimiento comprende:

(a) seleccionar una pluralidad de animales del estudio a partir de una o más clínicas,

- i) en que cada animal ha sido vacunado con la vacuna,
- ii) en que el tiempo desde la fecha de la última vacunación es de al menos aproximadamente un año,
- iii) en que el animal ha estado viviendo en un entorno sectorial durante al menos aproximadamente un año después de la fecha de la última vacunación,
- iv) en que cada animal tiene un registro de vacunas y sanitario, y
- v) en que cada animal ha sido evaluado en cuanto al riesgo de exposición a dicha enfermedad;

(b) asignar a dichos animales una categoría de riesgo según lo siguiente:

- i) los animales son considerados de riesgo elevado o riesgo bajo basados en la exposición a otros animales o vectores de enfermedades
 - (1) los animales de riesgo bajo con mantenidos en ambientes interiores y NO son expuestos a otros animales y vectores de enfermedades,
 - (2) los animales de riesgo elevado son animales que no están mantenidos en ambientes interiores y SÍ están expuestos a otros animales o vectores de enfermedades,

(c) asignar a cada animal un indicador de memoria inmune adecuada, en que ese indicador es un animal no inmune, un animal del primer indicador aka, o un animal inmune, un animal del segundo indicador aka, que comprende:

- i) evaluar dichos animales en cuanto a indicios clínicos de dicha enfermedad usando observaciones y dichos registros sanitarios desde la fecha de la última vacunación,
- ii) identificar los animales evaluados que tienen indicios de dicha enfermedad, estos son animales no inmunes, animales del primer indicador aka,
- iii) identificar dichos animales de riesgo elevado que viven en zonas de predominio de la enfermedad y que no tienen indicios de dicha enfermedad determinados mediante registros clínicos y/o confirmación de laboratorio de casos de enfermedades en dicha zona de vida, estos son animales inmunes, animales del segundo indicador aka,
- iv) evaluar una muestra de suero sanguíneo a partir de cada animal que no ha mostrado indicios clínicos de la enfermedad y que no es un animal de riesgo elevado que vive en una zona predominio de la enfermedad y que no tiene indicios de dicha enfermedad desde la fecha de la última vacunación,

ES 2 288 914 T3

- v) identificar los animales que tienen una respuesta inmune celular y/o un título de anticuerpos de al menos 2, estos son animales inmunes, animales del segundo indicador aka,
- vi) identificar los animales que no tienen respuesta inmune celular y/o un título de anticuerpos de menos de 2,
- vii) administrar una dosis de refuerzo de la vacuna a estos animales,
- viii) evaluar una muestra de suero sanguíneo de cada animal que ha recibido la dosis de refuerzo 3 días a 28 días a continuación de la dosis de refuerzo,
- ix) identificar los animales que tienen una respuesta anamnética adecuada de un aumento de al menos 4 veces del título de anticuerpos en suero, o un aumento estadísticamente significativo de la respuesta inmune celular, estos son animales inmunes, animales del segundo indicador aka,
- x) identificar los animales que no tienen una respuesta anamnética adecuada de un aumento de 4 veces del título de anticuerpos en suero, o un aumento estadísticamente significativo de la respuesta inmune celular, estos son animales no inmunes, animales del primer indicador aka, y

(d) determinar la duración de la memoria inmune adecuada para dichos animales, determinando ésta a partir de una duración de una ecuación de estimación de la memoria inmune adecuada, siendo deducida dicha duración de la ecuación de estimación de la memoria inmune adecuada mediante un análisis de regresión logística del primero y el segundo indicador y el registro de administraciones de las vacunas.

En una realización, el procedimiento comprende adicionalmente: (a) asignar el primer indicador a cada animal que ha mostrado indicios clínicos de la enfermedad desde la última vacunación o que no muestra un título adecuado de anticuerpos ni un título celular adecuado ni una respuesta anamnética adecuada; (b) designar cada animal que no ha sido asignado al primer indicador como un animal de riesgo elevado o un animal de riesgo bajo; (c) asignar cada animal de riesgo bajo que muestra una respuesta inmune celular o que muestra el título adecuado de anticuerpos o la suficiente respuesta anamnética, (d) asignar el segundo indicador a cada animal de riesgo elevado que no tiene un historial de la enfermedad en cuestión y cuando hay una evidencia del predominio de la enfermedad en cuestión en la región; y (e) asignar el segundo indicador a cada animal de riesgo elevado que no tiene un historial de la enfermedad en cuestión, que muestra la respuesta celular inmune o el título adecuado de anticuerpos o la suficiente respuesta anamnética.

Todavía, en otra realización preferida, la etapa de determinar la duración de la memoria inmune adecuada a partir del primero y el segundo indicadores y el registro de administración de la vacuna, comprende:

(a) determinar una fecha de reclutamiento para cada animal, en que la fecha de reclutamiento es la del comienzo de la evaluación del animal para detectar el marcador de inmunidad;

(b) asignar una fecha de comienzo del estudio como la fecha de reclutamiento para un primer animal de la pluralidad de animales reclutados en el estudio;

(c) asignar una variable X_j para cada animal como un número de días entre la fecha de comienzo del estudio y la fecha de reclutamiento del animal;

(d) asignar una variable XI para cada animal como un número de días entre la fecha de la última vacunación del animal y la fecha de reclutamiento del animal;

(e) determinar la duración de la memoria inmune adecuada a partir de una duración de la ecuación de estimación de la memoria inmune adecuada, en que dicha duración de la ecuación de estimación de la respuesta inmune adecuada es deducida mediante un análisis de regresión logística del primero y segundo indicadores y las variables X_j y XI .

En una realización, la duración de la ecuación de estimación de la respuesta inmune adecuada está en la forma $\text{logit}(p) = \beta_0 + \beta_1 X_{DI} + \beta_2 X_{CV} + C_k$, en la cual:

E es un nivel deseado de eficacia;

X_{DI} es la duración de la memoria inmune adecuada;

X_{CV} es un valor medio de XI ;

C_k es una constante que representa un efecto al azar para tener en cuenta la variación entre las clínicas y es deducida mediante regresión logística; y

$\beta_0, \beta_1, \beta_2$ son constantes deducidas por regresión logística.

En una realización más preferida del mismo, el modelo para la regresión logística para deducir los valores C_k , β_0 , β_1 y β_2 está en la forma $\text{logit}(p) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_1 + C_k$ en la cual:

Logit(p) es un vector que representa el estado inmune de los animales; y

C_k es la clínica de la que se seleccionó cada animal.

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la invención resultarán mejor comprendidas por referencia a la siguiente descripción detallada, ejemplos y reivindicaciones anejas.

Descripción detallada de la invención

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “duración la memoria inmune adecuada” para una vacuna particular significa el tiempo estimado en que un animal vacunado con la vacuna exhibirá un marcador de inmunidad para la enfermedad para la cual ha sido prescrita la vacuna.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “marcador de inmunidad” significa cualquier indicación de que un animal, que no ha mostrado indicios clínicos de la enfermedad en cuestión desde la fecha de la última vacunación, tiene una memoria inmunológica para la enfermedad. Según la definición de “marcador de inmunidad”, un animal que ha mostrado indicios clínicos de la enfermedad en cuestión desde al menos la fecha de la última vacunación, no tiene un marcador de inmunidad para la enfermedad. Ejemplos de marcadores de inmunidad incluyen los detectados mediante ensayos serológicos, como títulos de anticuerpos en circulación, títulos de anticuerpos secretores, respuestas celulares (por ejemplo, actividad de células B o T), niveles de citoquinas (por ejemplo, factor de necrosis tumoral, interferón gamma, etc.) y otros ensayos conocidos por los expertos en la técnica. Otros marcadores son detectados mediante análisis no serológicos, por ejemplo, si en una zona de riesgo de exposición elevado (por ejemplo, predominio elevado de la enfermedad o la densidad de población elevada), el animal no muestra los síntomas de la enfermedad. Esto es particularmente útil cuando los síntomas de la enfermedad son únicos. Los marcadores adecuados de inmunidad varían ampliamente con el animal y el riesgo de exposición del animal. Un experto puede escoger fácilmente el marcador de inmunidad apropiado dependiendo de la enfermedad, el animal y los factores de riesgo.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “animal” significa cualquier animal que pueda aprovechar la vacuna incluidos, pero sin limitación, animales de compañía, ganado y animales de granja, como vacas, ovejas, cabras y cerdos; aves como pollos, pavos y patos y animales de vida salvaje como ciervos y peces. Preferentemente, el animal es un animal de compañía.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la expresión “animal de compañía” es cualquier animal adiestrado o domesticado que es mantenido para una relación de compañía con seres humanos, por ejemplo, gatos, perros, caballos, pájaros, serpientes, hurones, hámster y similares.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, un “entorno sectorial” significa un asentamiento no es de laboratorio, en el que el animal vive bajo las condiciones y asentamientos típicos para los que el animal está adaptado o criado. Por ejemplo, el entorno sectorial para un animal de compañía está constituido por las condiciones y asentamientos típicos de la relación de mascota/propietario, como el hogar, patio o granero del propietario, y similares.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, el término “clínica” significa una agrupación particular de muestras de animales. Por ejemplo, una clínica para un estudio particular puede ser definida como una zona geográfica particular. Un experto en la técnica conocerá fácilmente el modo de definir la clínica para un estudio de memoria inmune adecuada, dependiendo de la enfermedad específica y el animal sometido a evolución. Ejemplos de clínicas incluyen, pero sin limitación, hospitales veterinarios, zonas de alimentación, granjas y graneros. El número alcance y selección de las clínicas para un estudio particular variarán con la naturaleza y el predominio de la enfermedad, y un experto en la técnica conocerá el modo de seleccionar estas variables para asegurar la validez del estudio.

La invención es de una naturaleza general y es útil para establecer la duración de la memoria inmune adecuada inducida por cualquier vacuna, conocida o que vaya a ser descubierta, en cualquier animal. Por ejemplo, los animales adecuados incluyen, pero sin limitación, animales de granja como bovinos, equinos, porcinos, aves de corral así como de vida salvaje, como peces y pájaros. La invención esta particularmente adecuada para medir una duración de una vacuna de memoria inmune adecuada en animales de compañía como perros o gatos. El tipo de vacuna puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica o los que vayan a ser desarrollados, por ejemplo, vacunas vivas modificadas, vacunas inactivadas, vacunas de DNA, vacunas vectorizadas o vacunas de subunidades o cualquier otro tipo de vacuna conocido o que vaya a ser descubierto. Ejemplos de vacunas para gatos y perros incluyen vacunas de núcleos y que no son de núcleos. Ejemplos de vacunas de núcleos felinas incluyen vacunas eficaces para panleucopenia, rinotraqueitis viral felina, calicivirus y rabia, mientras que las vacunas felinas que no son de núcleos incluyen vacunas para peritonitis infecciosa, leucemia y *Chlamydia psittaci*. Las vacunas caninas de núcleos incluyen vacunas diseñadas para moquillo, parvovirus, adenovirus y rabia, mientras que las vacunas caninas que no son de núcleos incluyen vacunas contra la parainfluenza, bordatella, borrelia y leptospira.

El procedimiento de administración de las vacunas puede ser cualquier procedimiento conocido en la técnica, como parenteral o intranasal. En una realización, la invención proporciona un procedimiento para determinar una duración

ES 2 288 914 T3

de memoria inmune adecuada inducida por una vacuna para una enfermedad, en un animal, en que el animal es un perro o un gato, y el procedimiento comprende:

(a) seleccionar una pluralidad de animales del estudio a partir del una o más clínicas,

i) en que cada animal ha sido vacunado con la vacuna,

ii) en que el tiempo desde la fecha de la última vacunación es de al menos aproximadamente un año,

iii) en que el animal ha estado viviendo en un entorno sectorial durante al menos aproximadamente un año después de la fecha de la última vacunación,

iv) en que cada animal tiene un registro de vacunas y sanitario; y

v) en que cada animal ha sido evaluado en cuanto al riesgo de exposición a dicha enfermedad;

(b) asignar a dichos animales una categoría de riesgo según lo siguiente:

i) los animales son considerados de riesgo elevado o riesgo bajo basados en la exposición a otros animales o vectores de enfermedades

(1) los animales de riesgo bajo con mantenidos en ambiente interior y NO son expuestos a otros animales y vectores de enfermedades,

(2) los animales de riesgo elevado son animales que no están mantenidos en ambientes interiores y SÍ están expuestos a otros animales o vectores de enfermedades,

(c) asignar a cada animal un indicador de memoria inmune adecuada, en que ese indicador es un animal no inmune, un animal del primer indicador aka o un animal inmune, un animal del segundo indicador aka que comprende:

i) evaluar dichos animales en cuanto a indicios clínicos de dicha enfermedad usando observaciones y dichos registros sanitarios desde la fecha de la última vacunación,

ii) identificar los animales evaluados que tienen indicios de dicha enfermedad, estos son animales no inmunes, animales del primer indicador aka,

iii) identificar dichos animales de riesgo elevado que viven en zonas de predominio de la enfermedad y que no tienen indicios de dicha enfermedad determinados mediante registros clínicos y/o confirmación de laboratorio de casos de enfermedades en dicha zona de vida, estos son animales inmunes, animales del segundo indicador aka,

iv) evaluar una muestra de suero sanguíneo a partir de cada animal que no ha mostrado indicios clínicos de la enfermedad y que no es un animal de riesgo elevado que vive en una zona predominio de la enfermedad y que no tiene indicios de dicha enfermedad desde la fecha de la última vacunación,

v) identificar los animales que tienen una respuesta inmune celular y/o un título de anticuerpos de al menos 2, estos son animales inmunes, animales del segundo indicador aka,

vi) identificar los animales que no tienen respuesta inmune celular y/o un título de anticuerpos de menos de 2,

vii) administrar una dosis de refuerzo de la vacuna a estos animales,

viii) evaluar una muestra de suero sanguíneo de cada animal que ha recibido la dosis de refuerzo 3 días a 28 días a continuación de la dosis de refuerzo,

ix) identificar los animales que tienen una respuesta anamnésica adecuada de un aumento de al menos 4 veces del título de anticuerpos en suero, o un aumento estadísticamente significativo de la respuesta inmune celular, estos son animales inmunes, animales del segundo indicador aka,

x) identificar los animales que no tienen una respuesta anamnésica adecuada de un aumento de 4 veces del título de anticuerpos en suero, o un aumento estadísticamente significativo de la respuesta inmune celular, estos son animales no inmunes, animales del primer indicador aka, y

(d) determinar la duración de la memoria inmune adecuada para dichos animales, determinando ésta a partir de una duración de una ecuación de estimación de la memoria inmune adecuada, siendo deducida dicha duración de la ecuación de estimación de la memoria inmune adecuada mediante un análisis de regresión logística del primero y el segundo indicador y el registro de administraciones de las vacunas.

El número de animales empleados en el estudio debe ser estadísticamente significativo. Un experto en la técnica puede determinar fácilmente un grupo estadísticamente significativo de animales dependiendo del predominio de la enfermedad de la zona densidad de población y la enfermedad sometida a estudio, usando técnicas bien conocidas (Steel, R.G.D. and Torrie, J.H. (1980), Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical Approach. 2nd Edition; y Cannon, R. M. and Roe, R.T. (1982) Livestock Disease Surveys: A Field Manual for Veterinarians, las cuales son ambas incorporadas como referencia a la presente memoria descriptiva).

Preferentemente, al menos aproximadamente 100 animales son incluidos en el estudio, más preferentemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 10.000 animales, lo más preferentemente de aproximadamente 300 a 1000 animales. En general, cuanto mayor sea el número, mayor será la exactitud del estudio, aunque la dificultad para seleccionar los animales y recoger los datos se eleva de forma proporcional.

Preferentemente, cada animal del estudio fue vacunado con la misma vacuna (es decir, preparada por el mismo fabricante mediante el mismo procedimiento), por la misma vía de administración de la vacuna (por ejemplo, inyección, subcutánea, parenteral, intramuscular o intranasal) y en el mismo sitio de vacuna. Preferentemente, los animales a los que se administró inapropiadamente la vacuna (por ejemplo, no fueron seguidas las instrucciones de la etiqueta o se administro una vacuna expirada, etc.) son excluidos del grupo de estudio.

La pluralidad de animales del estudio que comprende el grupo de estudio puede ser seleccionada a partir de clínicas y lugares de riesgo y geográficos diferentes. Un experto en la técnica será fácilmente capaz de escoger el grupo de estudio según la vacuna, enfermedad, animal, marcador de inmunidad que va a ser evaluado y el riesgo de exposición del animal. Cuando debido a la naturaleza del estudio, los animales son seleccionados a partir de una zona de riesgo exposición elevado, el marcador de inmunidad preferido carece de los indicios clínicos para la enfermedad. Preferentemente, estos indicios de la enfermedad serán patogenómicos. Por otra parte, cuando los animales son seleccionados de una zona de riesgo de exposición bajo, el marcador de inmunidad preferido es la evidencia de una respuesta de la vacuna (por ejemplo, ensayo sexológico). Estos marcadores son preferidos porque cuando los animales de estudio son seleccionados a partir de una zona de riesgo elevado, la exposición real a la enfermedad puede ser el origen de una memoria inmune serológica en lugar de la vacuna, y por tanto los datos serológicos no son concluyentes. Y naturalmente, cuando los animales del estudio son seleccionados a partir de una zona de riesgo de exposición bajo, la ausencia de indicios clínicos no es un marcador de inmunidad útil.

Los factores asociados con el riesgo de exposición a la enfermedad incluyen el medio ambiente del animal (entre otros, el predominio de la enfermedad y la densidad de población de animales en el lugar geográfico particular de los animales, el número de animales similares en el hogar (cuando el animal es un animal de compañía), si el animal es un animal de vida interior o exterior, si el animal es periódicamente alojado en un alojamiento para animales o perreras o si el animal tiene ocasión deambular libremente), la edad, estado general de salud, medicaciones actuales, sexo y cualquier enfermedad que pueda haber contraído el animal.

Un riesgo de exposición de los animales a una enfermedad específica en una zona geográfica particular es fácilmente determinado por un experto en la técnica. Los factores de riesgo pueden ser estimados por diversos medios. Estos procedimientos de estimación del riesgo de enfermedades pueden incluir datos publicados, modelación epidemiológica usando factores publicados, resultados de muestras de laboratorios de diagnóstico regionales/locales (es decir, la mayoría de los laboratorios mantienen registros de depósitos y diagnósticos, haciendo posible un cálculo de % positivo) y supervisiones clínicas.

En una realización preferida de la invención, la edad mínima de los animales es de 6 a 8 semanas. Esto es porque los niveles elevados de anticuerpos maternos en animales jóvenes (por debajo de aproximadamente 6 a 8 semanas de edad) puede impedir que algunas vacunas sean eficaces. Un sistema inmune de los animales responde lo más eficazmente a una vacunación después de la disminución desaparición de los anticuerpos maternos ((Schultz Vet. Med. 233-254, marzo de 1998 y Serge Martinod en "Advances in Veterinary Medicine", Vol. 41, Veterinary Vaccines and Diagnostics, Ronald D. Schultz ed. pág. 661 (1999)).

El historial de administración de vacunas a animales y clínico es obtenido para determinar la fecha de la última vacunación, si el animal ha estado viviendo en un entorno sectorial durante aproximadamente un año después de la fecha de la última vacunación y si el animal ha manifestado indicios clínicos de la enfermedad desde la fecha de la última vacunación. Preferentemente, la administración de vacunas a los animales y el historial clínico incluye también la guía de administración de las vacunas y el sitio de administración, fabricante y lote y número de serie y la fecha de expiración. Incluso más preferentemente, el historial de los animales incluye adicionalmente factores que indican el riesgo de que los animales contraigan la enfermedad, por ejemplo, el medio ambiente del animal así como la edad del animal, estado general de salud, medicaciones actuales, sexo, raza, si el animal ha sido castrado o desovariado y cualesquiera enfermedades que haya contraído el animal. Los datos relativos al medio ambiente del animal incluyen preferentemente factores como el predominio de la enfermedad en el lugar geográfico particular del animal, densidad de población del animal sometido a estudio, el número y tipo de animales en el hogar, si el animal es un animal de vida

exterior o interior, si el animal esta periódicamente alojado en alojamientos para animales o perreras y si el animal tiene ocasión de deambular libremente. Naturalmente, cuanto mayor sea la incidencia de contacto del animal con un gran número de otros animales similares, mayor será el riesgo de exposición del animal. Un estado general de salud escaso, una edad avanzada u otras condiciones que puedan comprometer el sistema inmune plantearán también al animal un mayor riesgo de contraer la enfermedad en cuestión. Además de ello, la incidencia anterior de la enfermedad y las medicaciones de prescripción actuales pueden situar también al animal en un riesgo mayor (informe de 1988 de la American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Vaccines J. Am. Vet. Med. Assoc. 212, 227-241 (1998)).

La administración de vacunas al animal y el historial anímico están disponibles en los registros veterinarios y de los propietarios de los animales. Actualmente no existe ningún sistema prescrito de mantenimiento de registro entre veterinarios, pero está recomendado por la comunidad de animales de compañía que el mantenimiento de los registros sea meticuloso y metódico (informe de la American Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Vaccines J. Am. Vet. Med. Assoc. 212, 227-241 (1998)). Un procedimiento para facilitar la transferencia de registros de veterinarios y propietarios de animales de compañía al fabricante que realice un estudio de la duración de la memoria inmune adecuada es el suministro de un cuestionario previamente franqueado al veterinario para generar los datos clínicos del animal y el historial de administración de vacunas. El cuestionario puede tener un tiempo preferido para su cumplimentación, después del cual el propietario del animal de compañía y el veterinario pueden completarlo y remitirlo al fabricante. El desprendimiento de las etiquetas de las vacunas que van a ser fijadas en el cuestionario puede facilitar este mantenimiento de los registros.

Una vez que el grupo de estudio ha sido seleccionado y que los historiales de clínicas y administración de vacunas han sido examinados y recopilados, es asignado el estado inmune para cada animal del estudio. Es asignado un primer indicador a cada animal que no muestra un marcador de inmunidad, preferentemente el primer indicador es un 0. Un segundo indicador es asignado a cada animal que muestra un marcador de inmunidad, preferentemente el segundo indicador es un 1.

El marcador de inmunidad particular ensayado dependerá de la enfermedad particular para la que está siendo ensayada la vacuna. Para los fines de la presente invención, cada animal que ha manifestado indicios clínicos de la enfermedad sometida a estudio, desde la fecha de la última vacunación, no tiene un "marcador de inmunidad". Los marcadores de inmunidad y los procedimientos para su ensayo son bien conocidos en la técnica, y el experto ordinario conocerá el procedimiento que hay que seleccionar dependiendo del estudio. Por ejemplo, una muestra de suero de sangre obtenida del propietario del animal o veterinario, puede ser analizada en cuanto a la presencia de anticuerpos en circulación. Otro marcador de inmunidad es una respuesta anamnésica para la enfermedad en cuestión (Manual of Clinical Laboratory Immunology, Fifth Edition, Editor: Noel R. Rose *et al.* (1997); Manual of Clinical Microbiology, 7th Edition, Editor: Patrick R. Murray *et al.* (1999); Clinical Microbiology Procedures Handbook, Editor: Henry D. Isenberg *et al.* (1992); S.Faine, Leptospira and Leptospirosis, Second Edition, (1994)).

Cuando la respuesta inmune primaria para una enfermedad específica está medida por células hay una diversidad de ensayos que pueden ser usados para identificar animales con un marcador de inmunidad. Por ejemplo, véase (Manual of Clinical Laboratory Immunology, Fifth Edition, Editor: Noel R. Rose *et al.* (1997)). La Tabla 1 siguiente recoge unos pocos ejemplos de marcadores de inmunidad adecuados para diversidad de vacunacones.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 288 914 T3

TABLA 1

Marcadores de inmunidad para diversas vacunas caninas

Enfermedad para la que está prescrita la vacuna	Marcador	Referencias
Rabia	Títulos seroneutralizantes	World Health Organization. 1992. Expert Committee on Rabies, 8th Report. World Health Organization, Technical Report Series no. 824, Ginebra.
Moquillo canino	Títulos seroneutralizantes Ab	Cooper et al. Bulletin Mensuel de la Societe Veterinaire Pratique de France 75, 13 1-152 (1991). Auby et al. Recueil de Médecine Vétérinaire 150, 33-36 (1974).
Parvovirus canino	Títulos seroneutralizantes Ab	Pollock et al. Journal of the American Veterinary Medical Association 180, 37-43 (1979).
Adenovirus canino	Títulos	Hartman et al.

ES 2 288 914 T3

Enfermedad para la que está prescrita la vacuna	Marcador	Referencias
CAV-1	seroneutralizantes Ab	Veterinary Immunology and Immunopathology 7,245-254 (1984).
<i>Leptospira canicola</i> y <i>icterohaemorrhagiae</i>	Títulos de IgG neutralizantes	Hartman et al. Veterinary Immunology and Immunopathology 7,245-254 (1984).
Coronavirus canino	IgA secretora	Tennant et al. Research in Veterinary Science 51, 11-18 (1991).
Parainfluenza canina de Bordetella Bronchiseptica	IgA secretora	Bemis DA. 1976. Bordetella bronchiseptica in dogs: Bacteriological studies, pathogenesis, immune response and antibiotic treatment. Ph.D. Thesis. Cornell University
Panleucopenia	Títulos seroneutralizantes Ab	Scott et al. Journal of the American Veterinary Medical Association 156,

ES 2 288 914 T3

Enfermedad para la que está prescrita la vacuna	Marcador	Referencias
		439-453 (1970). Johnson et al. Journal of the American Veterinary Medical Association 158, 876-884 (1971).
Rinotraqueitis	Función de inmunidad mediada por células	Johnson et al. Journal of the American Veterinary Medical Association 186, 149-152 (1985).
Rabia	Títulos seroneutralizantes	World Health Organization. 1992. Expert Committee on Rabies, 8th Report. World Health Organization, Technical Report Series no. 824, Geneva.
Calicivirus	Títulos seroneutralizantes Ab	Johnson et al. Journal of the American Veterinary Medical Association 186, 149-152 (1985).
<i>Chlamydia psittaci</i>	IgA secretora	IgA Mitzel et al. American Journal of Veterinary Research 38, 1361-1363 (1977).

Enfermedad para la que está prescrita la vacuna	Marcador	Referencias
FeLV	Títulos seroneutralizantes Ab	Ab Haffer et al. Vaccine 8:12-16 (1990). Tompkins et al. Companion Animal Practice July: 15-26 (1988).
Peritonitis infecciosa	IgA salivar	Pedersen Feline Practice 23:7-20 (1995).

En una realización preferida de la invención, es establecido un marcador de inmunidad cuando el suero de la sangre del animal contiene un nivel de título de anticuerpos de suero en sangre de al menos aproximadamente 2, o si el animal exhibe una fuerte respuesta anamnética tras la administración de una dosis de refuerzo de la vacuna. Una respuesta anamnética fuerte es un aumento de 4 veces del título de anticuerpos en suero al ser medido de 3 días a 28 días a continuación de la administración de una dosis de refuerzo de la vacuna en cuestión. La práctica convencional es extraer una muestra de suero de sangre y seguidamente administrará la dosis de refuerzo. Seguidamente, en 3 días a 28 días es tomada una segunda muestra de suero de sangre. Los sueros de la primera y de la segunda muestras de sangre son ensayados en cuanto a anticuerpos en paralelo. En presencia de una memoria inmunológica en un individuo sano, los niveles de anticuerpos en la segunda muestra de suero serán 4 veces mayores que los niveles en la primera muestra.

Una vez que es establecido el estado inmune para cada animal como se describió anteriormente, serán completados los datos para el grupo de estudio y serán analizados para determinar la duración de la memoria inmune adecuada. Cada clínica del animal (C_k), fecha de reclutamiento y fecha de la última vacunación serán registradas, y será determinado un valor en días para cada uno de X_i y X_j , en donde:

X_i es el tiempo en días i del animal entre la fecha de la última vacunación del animal para la enfermedad y la fecha de reclutamiento del animal;

X_j es el tiempo en días j del animal entre la fecha de reclutamiento del animal y la fecha de comienzo del estudio.

Como se usa en la presente memoria descriptiva, la “fecha de reclutamiento” para cada animal es el día en que el animal fue evaluado en cuanto a un marcador de inmunidad. Si el animal es valorado para más de un marcador de inmunidad, la fecha de reclutamiento es la fecha en el que el animal fue evaluado en cuanto al primer marcador de inmunidad. Por ejemplo, cuando el marcador de inmunidad es la detección de niveles de títulos de anticuerpos, la fecha de reclutamiento es el día en que se extrajo la primera muestra de sangre para un análisis de los títulos de anticuerpos. Si el análisis de los títulos de anticuerpos es negativo, y el animal es evaluado en cuanto a un marcador de inmunidad alternado, como una respuesta anamnética, la fecha de reclutamiento es todavía el día en que se extrajo la primera muestra de sangre para un análisis de los títulos de anticuerpos.

En la presente memoria descriptiva, cuando se hace referencia a la “fecha de la última vacunación”, la “fecha de vacunación” significa el día en que se concluye el protocolo de administración de la vacuna prescrita. Debe apreciarse que esta fecha no se corresponde necesariamente con la fecha en que es administrada una dosis de vacuna particular. A menudo, la vacunación de animales de compañía incluye una serie de administraciones de la vacuna a intervalos de tiempo cortos para establecer la inmunidad. Por ejemplo, puede ser necesario proporcionar dos o más dosis de una vacuna inactivada en un período de tiempo corto para conseguir la inmunidad, mientras que, en el mismo animal, las vacunas vivas modificadas a menudo inmunizan solamente después de una administración (informe de la American

Association of Feline Practitioners and Academy of Feline Medicine Advisory Panel on Feline Vaccines J. Am. Vet. Med. Assoc. 212, 227-241 (1998)). Otro ejemplo en el que la fecha de vacunación debe ser diferenciada de la fecha de administración de la vacuna es cuando a animales jóvenes (menos de aproximadamente 8 a 16 semanas) les son administradas múltiples dosis de vacunas, espaciadas a intervalos de 2 a 6 semanas. Este protocolo de administración de la vacuna está prescrito porque pueden estar presentes anticuerpos heredados por vía maternal en el suero de la sangre de los animales. Los anticuerpos heredados por vía maternal pueden anular la vacunación y, como se conoce exactamente cuando se disiparán estos anticuerpos, son recomendadas múltiples administraciones de la vacuna. Para la mayoría de los animales de compañía, los anticuerpos heredados por vía maternal desaparecen después aproximadamente 16 semanas de edad. Por ejemplo, el esquema recomendado de administración de una vacuna para el moquillo canino en mascotas es de una serie de tres inyecciones parenterales de una vacuna viva modificada (es decir, a las 6 a 8 semanas, a las 10 a 12 semanas y a las 14-16 semanas) (Council Report Journal of the American Veterinary Medical Association 195, 314-317 (1989)). Consecuentemente, en este caso, la fecha de vacunación es la fecha a la que es administrada la inyección de vacuna de 14-16 semanas. En la presente invención, en los casos en que el protocolo prescrito de administración de la vacuna no es seguido para un animal en particular, es preferible que el animal sea omitido del estudio.

La duración de la memoria inmune adecuada de la vacuna es estimada mediante una ecuación de predicción de la memoria inmune adecuada, apropiada para el modelo estadístico. La ecuación de predicción puede ser deducida mediante análisis de regresión logística de los datos de inmunidad obtenidos a partir de los animales reclutados en el estudio. La deducción de las ecuaciones de predicción mediante análisis de regresión logística de datos en bruto es bien conocida por los expertos en la técnica. Ejemplos de modelos pueden ser encontrados en las siguientes referencias: Agresti (1990), *Categorical Data Analysis*, 84-91; Beitler *et al.* *Biometrics*, 41, 991-1000 (1985); Davidian *et al.* *Biometrika* 80, 475-488 (1993); Harville *et al.* *Biometrics* 40, 393-408 (1984); Hosmer *et al.* (1989), *Applied Logistic Regression*; Longford *Computational Statistics and Data Analysis* 17, 1-15 (1994).

Una vez que es deducida la ecuación de predicción para una vacuna particular, puede ser resuelta para obtener la duración de la memoria inmune adecuada para la vacuna sometida a estudio, imputando un nivel de eficacia deseado. El nivel de eficacia deseado es el porcentaje de animales vacunados que no manifestarían indicios clínicos de la enfermedad si un grupo estadísticamente significativo fuera expuesto a la enfermedad en cuestión. Dicho de otro modo, el nivel de eficacia es la probabilidad de que un animal particular muestre manifestaciones clínicas si es expuesto a una estimulación virulenta de la enfermedad. La eficacia es un término relativo y ninguna vacuna inducirá una inmunidad completa para todos los animales en el sector. Para estar admitido a nivel federal, el grupo vacunado debe exhibir una enfermedad significativamente menor que el grupo testigo no vacunado tras una estimulación virulenta. Para la mayoría de las enfermedades, para una aprobación por la USDA, el nivel de eficacia debe ser de 80% (es decir, un 80% de los vacunados no deben mostrar enfermedad, Serge Martinod en *Advances in Veterinary Medicine*, Vol. 41, *Veterinary Vaccines and Diagnostics*, Ronald D. Schultz ed. pág. 635 (1999)).

La ecuación de predicción preferida es:

$$\text{Logit}(E) = \beta_0 + \beta_1 X_{DI} + \beta_2 X_{CV} + C_k$$

en la cual:

E es un nivel de eficacia deseado;

X_{DI} es la duración de la memoria inmune adecuada;

X_{CV} es un valor medio de X_j obtenido usando con programa de promedios como el procedimiento MEANS de SAS [este valor representa una covariable para ajustar posibles diferencias entre estaciones];

C_k es una constante que representa el efecto al azar en el modelo para tener en cuenta posible variación entre clínicas, C_k es deducida mediante regresión logística; y

β_0 , β_1 y β_2 son constantes deducidas por regresión logística.

El modelo estadístico preferido para la regresión logística para deducir los valores de C_k , β_0 , β_1 y β_2 es:

$$\text{Logit}(p) = \beta_0 + \beta_1 X_i + \beta_2 X_j + C_k$$

en la que X_i y X_j se definen con anterioridad, C_k es la clínica K (es decir, la clínica correspondiente al animal particular) y $\text{logit}(p)$ es un vector que representa los indicadores del estado inmune para cada animal en el grupo de estudio (por ejemplo, un vector que consiste en ceros y unos). Por tanto, p se convierte en la probabilidad de que un animal en el estudio exhiba un marcador de inmunidad.

Puede ser usado cualquier programa estadístico adecuado para regresión logística. Un ejemplo de modelos adecuados puede ser encontrado en el paquete de software de SAS (por ejemplo, la versión 8), bien conocido por los expertos

en la técnica. El procedimiento NLMIXED en SAS es el programa de regresión logística preferido. Pero pueden ser usados también los procedimientos LOGISTIC, TLOGISTIC, GENMOD o CATMOD en el paquete SAS.

Protocolos para determinar marcadores de inmunidad

5

Análisis serológico del virus del moquillo canino

Células de riñón de perro de los laboratorios Norden con un intervalo de paso de 126-143 son dispuestas en placas a 16.000 células por pocillo de la placa en medio esencial mínimo de Eagle/10% de suero bovino fetal. Las placas son incubadas a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente humidificado durante 24 horas hasta que se consigue la confluencia deseada de 20-30%. Muestras de suero canino inactivadas con calor, sueros de testigos positivos y testigos negativos son diluidas en serie 2 veces hasta los niveles apropiados en medio esencial mínimo de Eagle. Cada pocillo del ensayo del suero diluido es combinado con un volumen igual de suspensión de virus que contiene 100-316 dosis infecciosas de cultivos de tejidos de 50% (TCID₅₀) de virus del moquillo canino. Normalmente, se puede usar un virus no citopático. La mezcla de suero/virus es incubada durante 1 hora para permitir la neutralización del virus por un anticuerpo específico. El virus de estimulación es titulado para verificar la cantidad de virus usado en el ensayo (retrotitulación). A continuación de la incubación, el contenido de fluido de las placas es retirado y las placas son inoculadas con la muestra de suero/virus, cuatro repeticiones por dilución de suero. Las placas son incubadas durante 6 ± 1 días a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente humidificado. Las placas son seguidamente fijadas con acetona al 80%, aclaradas y teñidas con anticuerpo policlonal anti-CDV directo marcado con isotiocianato de fluoresceína. A continuación del procedimiento de teñido, las placas son leídas en cuanto a la presencia o ausencia de fluorescencia específica viral. Los pocillos que no exhiben fluorescencia ("FA") son valorados como un "+", indicando la presencia de anticuerpos neutralizantes. Los pocillos que contienen FA son valorados como "-" indicando la falta de anticuerpos neutralizantes. El título neutralizante en suero es calculado mediante el procedimiento de Spearman-Kärber. Un ensayo debe completar los siguientes criterios para ser considerado válido: 1. El nuevo título debe estar en el intervalo de 100-316 TCID₅₀. 2. El suero testigo positivo debe estar dentro del intervalo establecido (normalmente, es 36-145). 3. El suero testigo negativo debe tener un título de ≤ 2.

Análisis serológico de adenovirus canino tipo 2

30

Células de riñón de perro de los laboratorios Norden con un intervalo de paso de 126-143 son dispuestas en placas a 16.000 células por pocillo de la placa en medio esencial mínimo de Eagle/10% de suero bovino fetal. Las placas son incubadas a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente humidificado durante 3-5 días hasta que se consigue la confluencia deseada de 85-95%. Muestras de suero canino inactivadas con calor, sueros de testigos positivos y testigos negativos son diluidas en serie 2 veces hasta los niveles apropiados en medio esencial mínimo de Eagle. Cada pocillo del ensayo del suero diluido es combinado con un volumen igual de suspensión de virus que contiene 100-316 dosis infecciosas de cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀) de adenovirus canino de tipo 2. Normalmente, se puede usar un virus no citopático. La mezcla de suero/virus es incubada durante 1 hora para permitir la neutralización del virus por el anticuerpo específico. El virus de estimulación es titulado para verificar la cantidad de virus usada en el ensayo (retrotitulación). A continuación de la incubación, es retirado el contenido de fluido de las placas es retirado y las placas son inoculadas con la mezcla de suero/virus, cuatro repeticiones por dilución de suero. Las placas son incubadas durante 7+1 días a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente humidificado. Las placas son seguidamente fijadas con acetona al 80%, aclaradas y teñidas con anticuerpo policlonal directo anti-CAV marcado con isotiocianato de fluoresceína. A continuación del procedimiento de teñido, las placas son leídas en cuanto a la presencia o ausencia de fluorescencia específica viral. Los pocillos que no exhiben ("FA") son valorados como "+" indicando la presencia de anticuerpos neutralizantes. Los pocillos que contienen FA son valorados como "-" indicando la falta de anticuerpos neutralizantes. El título neutralización de suero es calculado mediante el procedimiento de Spearman-Kärber. Un ensayo debe cumplir los siguientes criterios para ser considerado válido: 1. El nuevo título debe estar en el intervalo de 100-316 TCID₅₀. 2. El suero testigo positivo debe estar dentro del intervalo establecido (normalmente, es 25-99). 3. El suero testigo negativo debe tener un título de ≤ 2.

Análisis serológico de virus de parainfluenza canino

Células de riñón de perro de los laboratorios Norden, con un intervalo de paso de 126-143, son dispuestas en placas a 16.000 células por pocillo de la placa en medio esencial mínimo de Eagle/10% de suero bovino fetal. Las placas son incubadas a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente humidificado durante 24 horas hasta que se consigue la confluencia deseada de 20-30%. Muestras de suero canino inactivadas con calor, sueros testigos positivos y testigos negativos son diluidas en serie 2 veces hasta los niveles apropiados en medio esencial mínimo de Eagle. Cada pocillo del ensayo del suero diluido es combinado con un volumen igual de suspensión de virus que contiene 100-316 dosis infecciosas de cultivo de tejidos al 50% (TCID₅₀) de virus parainfluenza canino. Normalmente, se puede usar un virus no citopático. La mezcla de suero/virus es incubada durante 1 hora para permitir la neutralización del virus por el anticuerpo específico. El virus de estimulación es titulado para verificar la cantidad de virus usada en el ensayo (retrotitulación). A continuación de la incubación, es retirado el contenido de fluido de las placas y las placas son inoculadas con la mezcla de suero/virus, cuatro repeticiones por dilución de suero. Las placas son incubadas durante 6 ± 1 días a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente humidificado. Las placas son seguidamente fijadas con acetona al 80%, aclaradas y teñidas con anticuerpo policlonal directo anti-CDV marcado con isotiocianato de fluoresceína. A continuación del procedimiento de teñido, las placas son leídas en cuanto a la presencia o ausencia de fluorescencia específica viral. Los pocillos que no exhiben FA son valorados como "+" indicando la presencia de anticuerpos neutralizantes. Los pocillos que con-

ES 2 288 914 T3

tienen FA son valorados como “-” indicando la falta de anticuerpos neutralizantes. El título neutralizante en suero es calculado mediante el procedimiento de Spearman-Kärber. Un ensayo debe cumplir los siguientes criterios para ser considerado válido: 1. El nuevo título debe estar en el intervalo de 100-316 TCID₅₀ 2. El suero testigo positivo debe estar dentro del intervalo establecido (normalmente, es 32-82). 3. El suero testigo negativo debe tener un título de ≤ 2 .

Análisis serológico de parvovirus

Células de riñón de perro de los laboratorios Norden, con un intervalo de paso de 126-143, son dispuestas en placas a 16.000 células por pocillo de la placa en medio esencial mínimo de Eagle/10% de suero bovino fetal. Las placas son incubadas a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente humidificado durante 24 horas hasta que se consigue la confluencia deseada de 20-30%. Muestras de suero canino inactivadas con calor, sueros testigos positivos y testigos negativos son diluidas en serie 2 veces hasta los niveles apropiados en medio esencial mínimo de Eagle. Cada pocillo del ensayo del suero diluido es combinado con un volumen igual de suspensión de virus que contiene 100-316 dosis infecciosas de cultivo de tejido al 50% (TCID₅₀) de parvovirus canino. Normalmente, se puede usar un virus no citopático. La mezcla de suero/virus es incubada durante 1 hora para permitir la neutralización del virus por el anticuerpo específico. El virus de estimulación es titulado para verificar la cantidad de virus usada en el ensayo (retrotitulación). A continuación de la incubación, es retirado el contenido de fluido de las placas y las placas son inoculadas con la mezcla de suero/virus, cuatro repeticiones por dilución de suero. Las placas son incubadas durante 3-4 días a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente humidificado. Las placas son seguidamente fijadas con acetona al 80%, aclaradas y teñidas con anticuerpo policlonal directo anti-CDV marcado con isotiocianato de fluoresceína. A continuación del procedimiento de teñido, las placas son leídas en cuanto a la presencia o ausencia de fluorescencia específica viral. Los pocillos que no exhiben FA son valorados como “+” indicando la presencia de anticuerpos neutralizantes. Los pocillos que contienen FA son valorados como “-” indicando la falta de anticuerpos neutralizantes. El título neutralizante en suero es calculado mediante el procedimiento de Spearman-Kärber. Un ensayo debe cumplir los siguientes criterios para ser considerado válido: 1. El nuevo título debe estar en el intervalo de 100-316 TCID₅₀ 2. El suero testigo positivo debe estar dentro del intervalo establecido (normalmente, 88-352). 3. El suero testigo negativo debe tener un título de ≤ 2 .

Análisis serológico de coronavirus canino

Células de riñón de felino de los laboratorios Norden con un intervalo de paso de 85-92 son dispuestas en placas a 50.000 células por pocillo de la placa en medio esencial mínimo de Eagle/10% de suero bovino fetal. Las placas son incubadas a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente humidificado durante 3 $\pm$ 1 días hasta que se consigue la confluencia deseada de 100%. Muestras de suero canino inactivadas con calor, sueros testigos positivos y testigo negativo son diluidas en serie 2 veces hasta niveles apropiados en BME + N-(2-hidroxietil)-piperazino-N’-(ácido 2-etanosulfónico) 10 mM + 4 μ g/ml de polibreno. Cada pocillo del ensayo del suero diluido es combinado con un volumen igual de suspensión de virus que contiene 100-316 dosis infecciosas de cultivo de tejidos al 50% (TCID₅₀) de coronavirus canino. La mezcla de suero/virus es mezclada e incubada durante 1 hora para permitir la neutralización del virus por el anticuerpo específico. El virus de estimulación es titulado para verificar la cantidad de virus usada en el ensayo (retrotitulación). A continuación de la incubación, es retirado el contenido de fluido de las placas y las placas son inoculadas con la mezcla de suero/virus, cuatro repeticiones por dilución de suero. Las placas son incubadas durante 5 $\pm$ 1 días a 37°C, 5% de CO₂ en un ambiente humidificado. Los pocillos son seguidamente leídos en cuanto a la presencia de virus mediante el efecto citopático (CPE). Los pocillos que no exhiben CPE son valorados como “+” indicando la presencia de anticuerpos neutralizantes. Los pocillos que contienen CPE son valorados como “-” indicando la falta de anticuerpos neutralizantes. El título neutralizante en suero es calculado mediante el procedimiento de Spearman-Kärber. Un ensayo debe cumplir los siguientes criterios para ser considerado válido: 1. El nuevo título debe estar en el intervalo de 100-316 TCID₅₀ 2. El suero testigo positivo debe estar dentro del intervalo establecido (normalmente, 27-108). 3. El suero testigo negativo debe tener un título de ≤ 2 .

Análisis serológico de Leptospira canicola

Son usados para este ensayo cultivos de fases vivas logarítmicas tardías o estacionaria temprana de *Leptospira canicola*. Muestras de suero canino inactivadas con calor, sueros testigos positivos y testigos negativos son diluidos en serie 2 veces hasta niveles apropiados en un diluyente. Es añadido un volumen igual de cultivo al suero diluido. La mezcla de suero/bacterias es mezclada e incubada durante 2 a 4 horas para permitir la aglutinación de bacterias por anticuerpos específicos. La suspensión en cada pocillo es microscópicamente examinada en cuanto a la aglutinación. El punto final es el pocillo más elevado en el que es registrada una aglutinación de 50%, medida mediante comparación de la densidad de leptospiras sin aglutinar con una suspensión testigo. Un ensayo debe cumplir los siguientes criterios para ser considerado válido: 1. El número de bacterias que debe ser usado para estimular cada pocillo debe ser entre 2 x 10⁸ y 1 x 10⁹ ml. 2. El suero testigo positivo debe estar dentro del intervalo establecido. 3. El suero testigo negativo debe tener un título de ≤ 2 .

Análisis serológico de Leptospira icterohaemorrhagiae

Son usados cultivos vivos de fase logarítmica tardía o estacionaria temprana de *Leptospira icterohaemorrhagiae* para el ensayo. Muestras de suero canino inactivadas con calor, sueros testigos positivos y testigos negativos son diluidas en serie 2 veces hasta niveles apropiados en un diluyente. Es añadido un volumen igual de cultivo al suero diluido. La mezcla de suero/bacterias es mezclada e incubada durante 2 a 4 horas para permitir la aglutinación de bacterias por anticuerpos específicos. La suspensión en cada pocillo es microscópicamente examinada en cuanto a la

aglutinación. El punto final es el pocillo más elevado en el que es registrada una aglutinación de 50% medida mediante la comparación de la densidad de leptospiras sin aglutinar con una suspensión testigo. Un ensayo debe cumplir los siguientes criterios para ser considerado válido: 1. El número de bacterias que debe ser usado para estimular cada pocillo debe ser entre 2×10^8 y 1×10^9 ml. 2. El suero testigo positivo debe estar dentro del intervalo establecido. 3. El suero testigo negativo debe tener un título de ≤ 2 .

Ejemplos

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente los procedimientos de la presente invención. Debe entenderse que la presente invención no esta limitada a los detalles específicos de los ejemplos proporcionados a continuación.

Ejemplo 1

Un estudio retrospectivo para determinar la duración de la memoria inmune adecuada de diversos componentes virales y bacterianos de vacunas Vanguard® 5/L o Vanguard Plus® 5/L en perros midiendo los títulos de anticuerpos y la respuesta de los anticuerpos a una revacunación.

1. Vacuna

Nombre genérico: Moquillo canino, adenovirus tipo 2, parvovirus, vacuna de para influenza, vacuna de virus modificado (MLV) y bacterina de *Leptospira canicola-icterohaemorrhagiae* (cultivos completos inactivados)

Marca registrada: Vanguard Plus® 5/L (código de producto APHIS 4639.22). n° de Licencia veterinaria de EE.UU.: 189

Formulación: Vacuna comercial

2. Animales del estudio

Especie Canina Tipo: Perros mixtos y de pura raza

Raza/cepa: Cualquiera Sexo: M y F (intactos o castrados)

Descripción: Adultos

Origen: Pacientes veterinarios de propiedad privada

Edad inicial: Mínimo: 2 Máximo: Unidades: años
ninguno

Pesos: Mínimo: Máximo: Unidades: libras
ninguno ninguno

3. Tratamiento

a. Especificaciones del sitio

Este estudio es un estudio clínico controlado realizado en múltiples sitios sobre regiones geográficas diversas en los Estados Unidos y Canadá. Se usó un protocolo común para todos los sitios. Aproximadamente 40-60 prácticas veterinarias participarán en el estudio. Cada sitio de estudio individual se espera que reclute un mínimo de 5 perros.

Los sitios son prácticas veterinarias de animales pequeños cuya clientela, mantenimiento de registros y nivel de cumplimiento proporcionarán una proporción elevada de pacientes reclutados. Las prácticas deben tener al menos un veterinario (el director del estudio o veterinario examinador designado por el director del estudio) que esté experimentado en la práctica veterinaria general y medicina. Las prácticas tendrán un historial de uso de Vanguard® 5/L o Vanguard Plus® 5/L durante los últimos 5 años. Los propietarios de los perros reclutados en el estudio deben estar dispuestos a participar en el estudio hasta que se completen todas las observaciones y se recojan todas las muestras.

b. Tratamiento previo

El tratamiento médico seguirá una práctica clínica normal y aceptada para cada animal de estudio. No serán usados los tratamientos recogidos bajo los "criterios de exclusión" y será registrado el uso de otras medicaciones concomitantes.

c. Procedimiento de identificación

Identificación individual de animales proporcionada por los propietarios y números únicos de informe de los casos.

d. Alojamiento

Los perros son mantenidos en ambientes domésticos normales y pueden ser albergados en la casa del cliente o en una acomodación separada para animales. Los perros pueden ser albergados con o sin otros animales.

e. Procedimientos de alimentación y suministro de agua

Práctica normal.

4. Diseño del estudio

Nº	Descripción	Tiempo	Vía	Animales/tratamiento
	del	desde		
	tratamiento	última		
		vacunación		
T1	Vanguard® Plus 5/L	≥12 meses	Subcutánea	Aprox. 500-1000

5. Procedimientos

Los perros son seleccionados para el estudio a partir de animales presentados a cada sitio. Los registros médicos de cada sitio son examinados para identificar perros adultos que han recibido una serie de vacunaciones de cebado, pero que no han sido vacunados durante 12 meses o más. La vacuna más recientemente administrada es Vanguard® 5/L o Vanguard® Plus 5/L. Se hace un intento de identificar una gama de animales que no han sido vacunados en 12 o 48 meses (o más), de forma que el estado inmune pueda ser valorado durante un período prolongado desde la última vacunación. La duración de la memoria inmune adecuada de los componentes individuales de la vacuna Vanguard® se determina en los perros seleccionados basándose en los títulos de anticuerpos en suero y/o una respuesta anamnética a la revacunación Vanguard® Plus 5/L.

ES 2 288 914 T3

La información general para todos los casos candidatos identificados es registrada y valorada en cuando a la admisibilidad. Solamente los animales que satisfacen todos los criterios de inclusión, y para los cuales no son de aplicación ninguno de los criterios de exclusión, son seleccionados para el reclutamiento del estudio.

- 5 Perros sanos de 2 años de edad o más, que no han sido vacunados en los últimos 12 meses o más, son admisibles para el reclutamiento. Se llama por teléfono a los propietarios de estos animales y se les pide que participen en el estudio. Serán registradas las razones para la no participación en el estudio.

a. Criterios de inclusión

- 10 1. Cualquier raza, sexo o peso de perro.
2. Perros sanos, 2 años de edad o más.
- 15 3. El perro no debe haber recibido una vacuna mono- o poli-valente que contenga adenovirus del moquillo canino de tipo 2, parvovirus, vacuna de parainfluenza, vacuna de virus vivos modificados; bacterina de *Leptospira canicola-icterohaemorrhagiae* en los últimos 12 meses o más. (Los perros pueden haber recibido vacunaciones de rabia, *Bordetella*, *Borrelia* o *Giardia*).
- 20 4. El perro debe tener un historial de vacunación documentado con al menos dos dosis de vacuna polivalente (que contiene moquillo canino, adenovirus de tipo 2, parvovirus, vacuna de parainfluenza, vacuna de virus vivos modificados, bacterina de *Leptospira canicola-icterohaemorrhagiae*, de cualquier fabricante) como una dosis de cebado (serie de vacunaciones a cachorros o inicial), siendo proporcionada la última dosis es cuando el animal tenía 12 semanas de edad o más.
- 25 5. El perro debe haber recibido al menos una vacuna polivalente adicional 9-14 meses después de la serie de cebado inicial.
- 30 6. La vacuna más reciente administrada debe ser Vanguard® 5/L o Vanguard Plus® 5/L.
7. El agente propietario/autorizado debe estar de acuerdo en hacer volver el animal de estudio a la práctica veterinaria para una evaluación en los momento requeridos.
- 35 8. El agente propietario/autorizado debe proporcionar un consentimiento informado escrito para que el animal participe en el estudio.
9. El propietario debe completar el cuestionario de valoración de estilo de vida y riesgo de enfermedades del animal.

b. Criterios de exclusión

- 40 1. Perros con un historial de intolerancia/alergia a vacunaciones.
- 45 2. Animales preñados.
3. Perros con enfermedad sistémica grave, ya sea o no una amenaza constante para la vida (fallo renal, fallo hepático, neoplasia terminal).
- 50 4. Perros tratados con cualquier fármaco inmunosupresor (corticoides que incluyen prednisolona y dexametasona u otros inmunosupresores como ciclofosfamida, azatioprina, y tiomalato de oro-sodio, etc.) en los 10 últimos días.
- 55 5. Perros tratados con fármacos anti-inflamatorios respiratorios (por ejemplo, acetato de metil-prednisolona) en los últimos 30 días.

c. Examen de pre-vacunación. Recogida y tratamiento de sangre

- 60 En la fecha de reclutamiento todos los perros recibirán un examen físico para determinar el estado de salud general de los perros. El propietario completará un cuestionario para documentar el estilo de vida y riesgo de enfermedades a los que está expuesto su perro.

65 En la fecha de reclutamiento (una vez que se confirma que el perro cumple los criterios de inclusión), se obtienen seguidamente aproximadamente 10 ml de sangre de la vena yugular (u otra vena periférica) antes de la vacunación. La sangre es recogida en un tubo separador de suero de 12 ml y se permite que coagule. La sangre es centrifugada, el suero es separado y dividido en parte alícuotas en dos tubos de transporte de plástico (repeticiones A y B). Las muestras de suero son almacenadas en congelación antes del transporte. Los tubos de plástico son etiquetados con el número de

ES 2 288 914 T3

identificación del animal, ID repetición y la fecha de recogida. Los impresos de envío del laboratorio (suministrados por el laboratorio) y los impresos de custodia de la cadena son completados para cada envío de muestras. Las muestras congeladas (repetición A) son transportadas sobre hielo semanalmente, hasta un laboratorio predeterminado. Tras recibir la confirmación de la muestra primaria, las muestras de seguridad (repetición B) serán también transportadas sobre hielo hasta el laboratorio colaborador. El laboratorio es ocultado en el historial de vacunación del animal. Son registradas las fechas de recogida de muestras de sangre y vacunación.

Se identifica un laboratorio para analizar todas las muestras serológicas. Se pide al laboratorio que estandarice y valide todos los ensayos con el fin de cumplir los requisitos reguladores.

d. Administración del tratamiento

En el día 0, después de la recogida de muestras de suero previas a la vacunación, se administra a los perros una dosis (1 ml) de Vanguard Plus® 5/L como direcciones por etiqueta.

e. Recogida y tratamiento de sangre posteriores a la vacunación

De 3 a 7 días (días del estudio 4-6) después de la vacunación, el perro es nuevamente examinado y es obtenida y tratada una segunda muestra de sangre (como se describió anteriormente para las muestras previas a la vacunación) y es registradas. Una vez que es recogida la muestra posterior a la vacunación, el perro es considerado fuera del estudio.

f. Títulos serológicos

Los siguientes títulos de anticuerpos son determinados para cada muestra de suero. Título neutralizante en suero ("SN") del virus del moquillo canino; título SN de parvovirus canino; título SN de adenovirus canino tipo 1; título SN de adenovirus canino tipo 2; título SN de virus de parainfluenza canino; título de aglutinación microscópica ("MA") de *Leptospira interrogans ser. icterohaemorrhagiae*; título MA de *Leptospira interrogans ser. Canicola*.

La prioridad para el análisis de las muestras es como sigue:

1. Título SN de virus del moquillo canino;
2. Título SN de parvovirus canino;
3. Título SN de adenovirus canino tipo 1;
4. Título SN de adenovirus canino tipo 1;
5. Título MA de *Leptospira interrogans ser. icterohaemorrhagiae*;
6. Título MA de *Leptospira interrogans ser. Canicola*;
7. Título SN de virus de parainfluenza canino.

g. Recogida y tratamiento de sangre

1. Se recogen aproximadamente 10 ml de sangre en un tubo para vacunas (parte superior roja) separador de suero. La sangre puede ser recogida mediante jeringuilla, o directamente en el tubo para vacunas.

2. Se permite que la sangre coagule un mínimo de 20 minutos pero no más de 40 minutos.

3. Se centrifuga la sangre coagulada durante un mínimo de 5 minutos a la velocidad apropiada.

4. Se retira el tapón de caucho rojo del tubo separador y se vierte o se pipetea cuidadosamente suero en dos partes alícuotas aproximadamente iguales en dos tubos de transporte de plástico. Se cierran los tubos de transporte de plástico con el tapón proporcionado y se aplican etiquetas con el nombre del animal, número de identificación del animal y fecha de recogida. Se congelan las muestras a aproximadamente -20°C. Si es usada una pipeta para transferir suero, debe ser usada una nueva pipeta para cada muestra.

5. La sangre debe ser tratada y congelada en dos horas desde su recogida.

h. *Enfermedad/medicación concurrente*

Si se estiman necesarios procedimientos de medicación, médicos o quirúrgicos, entonces se siguen procedimientos estándar de la práctica veterinaria. No están permitidas medicaciones concurrentes (distintas de las medicaciones concurrentes permisibles definidas), procedimientos médicos o quirúrgicos sin el previo consentimiento del director de estudio, con la excepción de emergencias extremas, cuando incluso retrasos cortos serían una amenaza para la vida o provocarían un sufrimiento excesivo. Los animales pueden ser retirados del estudio si está recomendado.

Los perros pueden ser tratados con las siguientes medicaciones durante el transcurso del estudio, con un uso documentado para incluir fármaco, dosificación, duración y razón para el uso:

1. Preventivo diario o mensual del parásito del corazón (por ejemplo, selamectina, dietilcarbamazina, ivermectina, milbemicina).

2. Preventivo de pulgas mensualmente por vía oral (por ejemplo, lufenuron).

3. Tratamiento tópico de pulgas (por ejemplo, selamectina, imidacloprid, organofosfato o pulverizaciones, gotas o polvos basados en piretroides).

4. Dietas de prescripción.

5. Antihelmínticos orales (por ejemplo, pyrantel, albendazol, fenbendazol)

6. Medicaciones para regular trastornos médicos subyacentes (por ejemplo, antimicrobianos o complementos de tiroides) pueden ser usados si el uso está documentado para identificar fármaco, dosificación, duración, fechas y razón para su uso.

6. *Tratamiento de datos y análisis estadístico*

Los animales son divididos en categorías en forma de grupos basados en el período de tiempo entre su última vacunación y su entrada en el estudio como sigue:

12-18 meses

19-24 meses

25-30 meses, etc.

Un animal es colocado en una de las 4 categorías de riesgo basadas en el cuestionario de estilo de vida y riesgos expuestos. La categorías son de exposición baja a otros perros y exposición baja a otros vectores de enfermedades (baja-baja), exposición baja a otros perros y exposición elevada a otros vectores de enfermedades (baja-elevada), exposición elevada a otros perros y exposición baja a otros vectores de enfermedades (elevada-baja) y exposición elevada a otros perros y exposición elevada a otros vectores de enfermedades (elevada-elevada).

En esta aplicación, la expresión “animal de riesgo elevado”, ya sea aplicado a perros, a gatos u otro animal, se aplica a cualquier animal que cumpla los criterios para su inclusión en cualquiera de las categorías elevada-baja o elevada-elevada, mientras que la expresión “animal de riesgo bajo” se aplica a cualquier animal que cumpla los criterios para su inclusión en cualquiera de la categoría baja-baja o baja-elevada.

a. *Cuestionario de estilo de vida y exposición a riesgos*

1. ¿Cuál de lo siguiente describe mejor la zona en que viven usted y su perro? (marque una)

☐ ciudad

☐ suburbio

☐ población, pueblo o caserío

ES 2 288 914 T3

	☐ granja o rancho
5	2. En años, ¿Cuánto tiempo ha vivido usted en su domicilio actual?
10	3. En total, ¿Cuántos perros hay en su hogar? (si hay solamente un perro en su hogar, pase a la pregunta 4)
	3a. ¿Cuántos de estos perros tienen un año o más de edad?
15	3b. ¿Cuántos de estos perros tienen menos de un año de edad?
20	3c. ¿Han sido adquiridos perros nuevos durante el último año?
25	4. Durante el último año ¿llevó a su perro fuera de hogar para practicar ejercicio, orinar o defecar? Si la respuesta es negativa pase a la pregunta 5.
30	☐ sí ☐ no
35	Cuando usted lleva/deja que su perro salga fuera: 4a. ¿Confina su perro en una perrera, área vallada o patio?
40	☐ sí ☐ no
45	4b. ¿Ata su perro a para pasear a una correa, árbol, poste o estaca?
50	☐ sí ☐ no
55	4c. ¿Saca a pasear a su perro con correa?
60	☐ sí ☐ no
65	4d. ¿Permite que su perro deambule libremente con supervisión (es decir, está su perro visible en todo momento)?
	☐ sí ☐ no
	4e. ¿Permite que su perro deambule libremente sin supervisión?

5	☐ sí ☐ no
10	4f. ¿Pasea o hace ejercicio su perro en un parque, campo u otra zona en que pasean o hacen ejercicio otros perros? ☐ sí ☐ no
15	Durante el último año, cuando su perro estuvo en el exterior: 4g. ¿Paseó o hizo ejercicio o jugó con otros perros en su hogar? ☐ sí ☐ no
20	
25	4h. ¿Paseó o hizo ejercicio o jugó con otros perros fuera de su hogar? ☐ sí ☐ no
30	
35	4i. ¿Alguna vez luchó, mató o compartió cuencos de alimentos o agua con un animal salvaje? ☐ sí ☐ no
40	
45	4j. ¿Alguna vez bebió de charcos de agua, estanques, corrientes, ríos o lagos? ☐ sí ☐ no
50	
55	4k. ¿Alguna vez nadó en estanques, corrientes, río o lagos? ☐ sí ☐ no
60	4l. ¿Alguna vez comió basura, desechos, huesos de animales o desperdicios? ☐ sí ☐ no
65	4m. ¿Alguna vez comió las heces de otro perro? ☐ sí

	☐ no
5	5. ¿Alguna vez llevó a su perro a un espectáculo canino o pruebas en el campo?
	☐ sí
	☐ no
10	6. ¿Llevó alguna vez a su perro a clases de adiestramiento?
15	☐ sí
	☐ no
20	7. ¿Alguna vez llevó a su perro a una residencia para perros?
	☐ sí
	☐ no
25	8. ¿Alguna vez fue amaestrado su perro por un adiestrador profesional?
30	☐ sí
	☐ no

Un animal es clasificado como bajo-elevado si la respuesta a la pregunta 3 es "1", la respuesta a la pregunta 4 es "sí", la respuesta al menos una de las preguntas 4a, 4b o 4c es "sí", las respuestas a las preguntas 4d y 4e son "no", la respuesta a la pregunta 4f es "sí", las respuestas a las preguntas 4g y 4h, son "no", la respuesta al menos a una de las preguntas 4i, 4j, 4k, 4l y 4m es "sí" y las respuestas a las preguntas 5, 6, 7 y 8 son "no".

Un animal es colocado en la categoría elevada-baja si la respuesta a la pregunta 3 es "1", la respuesta a la pregunta 4 es "no", las respuestas al menos a una de las preguntas 5, 6, 7 ó 8 es "sí", o si la respuesta a la pregunta 3 es ">1", la respuesta a la pregunta 4 es "sí", la respuesta al menos a una de las preguntas 4a, 4b o 4c es "sí", las respuestas a las preguntas 4d, 4e y 4f son "no", la respuesta al menos a una de las preguntas 4g, 4h, 5, 6, 7 o 8 es "sí" y las respuestas a las preguntas 4i, 4j, 4k, 4l y 4m son "no".

El animal es clasificado como elevado-elevado si la respuesta a la pregunta 3 es ">1", la respuesta a la pregunta 4 es "sí", la respuesta al menos a una de las preguntas 4d y 4e es "sí", la respuesta a la pregunta 4f es "sí", la respuesta al menos a una de las preguntas 4g, 4h, 5, 6, 7 y 8 es "sí" y la respuesta al menos a una de las preguntas 4i, 4j, 4k, 4l y 4m es "sí".

7. Determinación de si un animal es inmune

En las zonas en las que los registros clínicos indican el predominio de una enfermedad activa (o los datos de laboratorio de diagnóstico local confirman casos de enfermedades activas), los animales que son clasificados a un riesgo distinto bajo y que no tienen un historial de la enfermedad de interés, deben ser considerados también inmunes (siendo considerado esto una evidencia de inmunidad por cuanto permanecen sanos incluso cuando son expuestos a la enfermedad en el medio ambiente). En zonas de predominio baja (o cero) de la enfermedad, los animales de cualquier nivel de riesgo serán asignados al estado inmune/no inmune basándose en los títulos de anticuerpos residuales posteriores a la vacunación y las respuestas anamnéticas.

Un animal es considerado inmune a una enfermedad específica si el nidal tiene niveles de anticuerpos que indican una respuesta inmune continuada para esa enfermedad en el momento de la entrada en el estudio y/o una respuesta anamnética para esa enfermedad en 3-7 días posteriores a la vacunación y el animal no tiene un historial previo de tener esa enfermedad. Los títulos de anticuerpos que indican una respuesta inmune continuada son definidos como sigue:

- a) Título SN de virus del moquillo canino $\geq 1:16$
- b) Título SN de parvovirus canino $\geq 1:16$

ES 2 288 914 T3

c) Título SN de adenovirus canino, tipo 1 $\geq 1:16$

d) Título SN de adenovirus canino, tipo 2 $\geq 1:16$

5 e) Título SN de virus de parainfluenza canino $\geq 1:14$

f) Título MA de *Leptospira interrogans ser. icterohaemorrhagiae* $\geq 1:18$

10 g) Título MA de *Leptospira interrogans ser. Canicola* $\geq 1:18$.

Una respuesta anamnésica es definida como un aumento en los títulos de anticuerpos de dos o más diluciones dobladas (aumento de cuatro veces) entre la muestra de sangre obtenida antes de la revacunación y la muestra de sangre obtenida 3-7 días después de la revacunación.

15 La relación entre el tiempo previo a la vacunación y el estado inmune/no inmune es usado para valorar la duración de la memoria inmune adecuada para cada enfermedad, usando el modelo de regresión logística anteriormente expuesto. Solamente los animales con la primera y la segunda muestras de sangre son incluidos en el análisis. Las estimaciones del modelo de regresión logística son usadas para determinar la duración de la memoria inmune adecuada para cada antígeno, definida como el valor del tiempo previo a la vacunación previsto para el que el porcentaje de
20 animales inmunes es $\geq 80\%$.

8. Informe de experiencias adversas

25 Todos los perros admitidos en el estudio y a los que se administró la vacuna son observados por el veterinario y el propietario de la mascota en cuanto a la aparición de cualesquiera indicios clínicos anormales durante los 10 días siguientes.

30 El director del estudio documentará cualesquiera informes telefónicos de indicios clínicos inesperados o anormales hechos por el propietario/agentes y, basándose en un criterio profesional, determinará si los indicios clínicos anormales observados aconsejan un examen fuera de programa del animal.

En el caso improbable de que un animal muera por cualquier razón durante el transcurso del estudio, debe ser realizada una necropsia por un veterinario o un patólogo veterinario, para determinar la causa de la muerte.

35 Ejemplo 2

40 Un estudio prospectivo para determinar la duración de la memoria inmune adecuada de diversos componentes virales y bacterianos de Felocell® CVR (nombre genérico: herpesvirus-calicivirus de panleucopenia felina, vacuna modificada de virus vivos) en gatos midiendo títulos de anticuerpos, incidencia de la enfermedad y valoración del riesgo de exposición a la enfermedad durante el tiempo.

1. Animales del estudio

45	Especie	Felina	Tipo:	Cualquiera
	Raza/Cepa	Cualquiera	Sexo:	Macho o hembra
				(intacto o
50				castrado)
	Descripción	Adultos		
	n:			
55	Origen:	Pacientes de	veterinarios de	propiedad
		privada		
60	Edad	Min: 2	Max: 3	Unidades: Años
	inicial:			
	Pesos:	Min: ninguno	Max:	Unidades: libras
65			ninguno	

2. Tratamiento

a. Especificaciones del lugar

5 Este estudio es un ensayo clínico controlado realizado en múltiples lugares de diversas regiones geográficas de los Estados Unidos y Canadá. Es usado un protocolo común para todos los sitios. Participarán aproximadamente 80-100 prácticas veterinarias en el ensayo. Cada sitio de estudio individual se espera que reclute un mínimo de 25 a 30 gatos.

10 Los sitios son centros de prácticas veterinarias de animales pequeños cuya clientela, mantenimiento de registros y cumplimiento de las normas proporcionarán una elevada proporción de animales de estudio reclutados que completen satisfactoriamente el estudio. Los propietarios de los gatos deben estar dispuestos a participar en el estudio hasta completar todas las observaciones y que se recojan todas las muestras. Las prácticas deben tener al menos un veterinario (el director del estudio o veterinario examinador designado por el director del estudio) que esté experimentado en la
15 práctica veterinaria y médica general.

Las prácticas tendrán un historial del uso de Felocell® CVR durante al menos tres años.

20 b. Tratamiento previo

El tratamiento médico seguirá la práctica clínica normal aceptada para cada animal del estudio. Es registrado el uso de las medicaciones concomitantes.

25 c. Procedimiento de identificación

La identificación individual de los animales es proporcionada por los propietarios y los números únicos de los informes de los casos.

30

d. Alojamiento

35 Los gatos son mantenidos en ambientes domésticos normales y pueden ser albergados en la casa del cliente o en una acomodación separada para animales. Los gatos pueden ser albergados con o sin otros animales.

e. Procedimientos de alimentación y suministro de agua

40 Práctica normal.

3. Grupos de estudio

45 Los gatos son seleccionados para el estudio entre animales presentados a cada práctica veterinaria de forma que estén representados diferentes grupos de riesgo. Los registros médicos de cada sitio son examinados para identificar gatos adultos que satisfagan todos los criterios de inclusión y para los que no sean de aplicación ninguno de los criterios de exclusión.

50 Los animales son asignados de estudio T01 o T02. Los animales seleccionados para el grupo de estudio T01 servirán como testigos positivos y recibirán vacunaciones anualmente basadas en las actuales recomendaciones de las etiquetas para Felocell® CVR. Los animales seleccionados para el grupo de estudio T02 no serán revacunados, pero los títulos de los anticuerpos y la incidencia de la enfermedad serán verificados durante todo el estudio. En el día 0, son registrados el historial de la enfermedad y el análisis de riesgos de la enfermedad y es realizado un examen físico
55 completo de cada animal. También en el día 0, a los gatos en T01 se les administra una dosis de Felocell® CVR por vía subcutánea como se indica en las instrucciones de la etiqueta.

60	Nº	Tiempo desde la	Vía	Sistema de	Animales
		última vacunación		vacunación	
	T01	Aprox. 12-24 meses	Subcutánea	Anualmente	Aprox. 500
65	T02	Aprox. 12-24 meses	N/A	N/A	Aprox. 1000

ES 2 288 914 T3

a. Criterios de inclusión para el grupo de estudio T01

1. Cualquier raza, sexo o peso de gato.

2. Gatos sanos, de 2-3 años de edad.

3. El gato ha sido vacunado con Felocell® CVR en los últimos 11-13 meses. Los gatos pueden haber recibido vacunaciones para la rabia, leucemia felina, peritonitis infecciosa felina o *Bordetella* en los últimos 12 meses.

4. El gato debe tener un historial de vacunación con un mínimo de dos dosis Felocell® CVR proporcionadas como un empaste en forma de una dosis de cebado y la última dosis es administrada cuando el animal tiene 12-16 semanas de edad o más.

5. El gato debe haber recibido al menos una dosis adicional de Felocell® CVR a los 9-14 meses después de la serie de cebado inicial.

6. El nombre, tipos de producto y números de serie de las vacunas Felocell® CVR usadas y las fechas de vacunación deben ser registrados en el registro médico del animal de estudio.

7. El propietario/agente autorizado debe estar de acuerdo con hacer volver el animal de estudio a la práctica veterinaria para una evaluación y recogida de muestras en los momentos requeridos.

8. El propietario/agente autorizado debe proporcionar un consentimiento informado escrito para que el animal participe en el estudio.

9. El propietario debe completar el cuestionario de historial de enfermedades y análisis de riesgo de enfermedades en cualquier visita programa o por teléfono (Apéndice IV, impreso 7).

b. Criterios de inclusión para el grupo de estudio T02

1. Cualquier raza, sexo o peso de gato.

2. Gatos sanos, de 2-3 años de edad.

3. El gato no tiene que haber sido vacunado con Felocell® CVR en los últimos 12-24 meses. Los gatos pueden haber recibido una vacuna mono- o poli-valente que contenga herpesvirus-calicivirus de panleucopenia felina y *Chlamydia psittaci* en los últimos 11-25 meses. Los gatos pueden haber recibido vacunaciones de rabia, leucemia felina, peritonitis infecciosa felina o *Bordetella* en los últimos 12 meses.

4. El gato debe tener un historial de vacunación con un mínimo de dos dosis de Felocell® CVR proporcionadas como un empaste en forma de una dosis de cebado, y la última dosis es administrada cuando el animal tiene 12-16 semanas de edad o más.

5. El gato debe haber recibido al menos una dosis adicional de Felocell® CVR a los 9-14 meses después de la serie de cebado inicial.

6. El nombre, tipos de producto y números de serie de las vacunas Felocell® CVR usadas y las fechas de vacunación deben ser registrados en el registro médico del animal de estudio.

7. El propietario/agente autorizado debe estar de acuerdo con hacer volver el animal de estudio a la práctica veterinaria para una evaluación y recogida de muestras en los momentos requeridos.

8. El propietario/agente autorizado debe proporcionar un consentimiento informado escrito para que el animal participe en el estudio.

9. El propietario debe completar el cuestionario de análisis de riesgo en cada visita programa o por teléfono.

c. Criterios de exclusión para todos los gatos

1. Los gatos con un historial de intolerancia/alergia a vacunaciones.

2. Animales preñados.

3. Gatos con una enfermedad sistémica grave, tanto si es una amenaza constante para la vida como si no lo es (fallo renal, fallo hepático, neoplasia terminal).

ES 2 288 914 T3

4. Gatos tratados con cualquier fármaco inmunosupresores (corticoesteroides que incluyen prednisolona y dexametasona u otros inmunosupresores como ciclofosfamida, azatioprina, y tiomalato de oro-sodio, etc.) en los 10 últimos días.

5. Gatos tratados con fármacos anti-inflamatorios respiratorios (por ejemplo, acetato de metil-prednisolona) en los últimos 30 días.

6. Gatos que son FeLV o FIV positivos en un ensayo ELISA.

4. Cuestionario de análisis de riesgos

Los animales son colocados en una de dos categorías de riesgos basadas en el estilo de vida y enfermedades según las siguientes preguntas contestadas por el propietario de la mascota.

1. ¿Cuál de los que sigue describe mejor la zona en que viven usted y su gato? (marque una)

☐ ciudad

☐ suburbio

☐ población, pueblo o caserío

☐ granja o rancho

2. En años, ¿cuánto tiempo ha vivido usted en su hogar actual?

3. En total, ¿cuántos gatos hay en su hogar? (si hay solamente un gato en su hogar, pase a la pregunta 4)

ES 2 288 914 T3

5	3a. ¿Cuántos de estos gatos tienen un año de edad o más?
10	3b. ¿Cuántos de estos gatos tienen menos de un año de edad?
15	3c. ¿Han sido adquiridos gatos nuevos durante el último año?
20	4. ¿Cuál de lo que sigue describe mejor el alojamiento de su(s) gato(s)? (marque uno)
25	☐ Todos los gatos están en el interior un 100% del tiempo
30	☐ Uno o más gatos salen fuera pero no todos los días
35	☐ Uno o más gatos salen fuera todos los días
40	☐ Uno o más gatos están en el exterior un 100% del tiempo
45	5. ¿Cuál de lo que sigue describe mejor el alojamiento del gato aquí en la actualidad? (marque uno)
50	☐ Todos los gatos están en el interior un 100% del tiempo
55	☐ Uno o más gatos salen fuera pero no todos los días
60	☐ Uno o más gatos salen fuera todos los días
65	☐ Uno o más gatos están en el exterior un 100% del tiempo
70	6. ¿Mandó a su gato a un alojamiento para animales en algún momento durante el último año? (marque uno)
75	☐ sí
80	☐ no
85	7. ¿Se escapó alguna vez su gato de la casa y estuvo perdido o deslocalizado durante más de 24 horas? (marque uno)
90	☐ sí
95	☐ no
100	8. ¿Ha llevado a su gato a espectáculos de gatos? (marque uno)
105	☐ sí
110	☐ no

Un animal es situado en la categoría de riesgo bajo si a respuesta a la pregunta 3 es "1", la respuesta a la pregunta 5 es "100% en el interior" y las respuestas a las preguntas 6, 7 y 8 son "no" o si la respuesta a la pregunta 3 es "2" ó "3", la respuesta a la pregunta "3c", las respuestas 4 y 5 son "100% en el interior" y las respuestas a las preguntas 6, 7 y 8 son "no". En otro caso el animal es situado en la categoría de riesgo elevado. La categoría de riesgo es determinada para cada momento en que es completado un cuestionario. Para fines de análisis estadísticos, una vez que el animal es situado en una categoría elevada en cuanto a exposición a otros gatos o exposición a otros vectores de enfermedades, puede volver a ser clasificado en esa categoría como bajo.

5. Procedimientos

a. Exámenes, recogida de suero y vacunación para el grupo de estudio T01

5 A continuación del examen inicial de la fecha de reclutamiento, los propietarios de gatos en el grupo de estudio T01 son entrevistados personalmente o por teléfono a intervalos de 6 meses (26 ± 2 semanas) de duración del estudio para determinar el historial de la enfermedad y llevar a cabo un análisis de riesgos de enfermedades. El historial de enfermedades y el análisis de riesgos de enfermedades se producirán personalmente en los primeros 6 meses de examen y nuevamente al cabo de 1 año, porque es necesario que los gatos visiten la clínica participante para la recogida de muestras de sangre, para determinar los títulos de anticuerpos en suero. Las muestras de sangre no serán recogidas más allá de un año para los gatos de T01. A los gatos se les administra una dosis de Felocell® Plus® 5/L por vía subcutánea como en las indicaciones de la etiqueta cada intervalo de 12 meses (52 ± 2 semanas) durante el período del estudio.

b. Exámenes y recogida de suero para el grupo de estudio T02

15 Para los gatos en el grupo de estudio T02, en la fecha de reclutamiento, son registrados el historial de la enfermedad y el análisis de riesgos de enfermedades y es realizado un examen físico para cada animal. También en la fecha de reclutamiento (una vez que se ha confirmado que el gato cumple los criterios de admisión), son obtenidos aproximadamente cinco (5) ml de sangre completa de la vena yugular (u otra periférica).

25 Los gatos en el grupo de estudio T02 son nuevamente examinados a intervalos de 6 meses (26 ± 2 semanas) a continuación del examen inicial durante el período del estudio. En la visita de cada 6 meses, será registrado el historial de enfermedades y el análisis de riesgo de enfermedades, se realizara un examen físico y se recogerán muestras de sangre para la determinación de los títulos de anticuerpos en suero. Cuando los títulos de anticuerpos en suero caigan por debajo de niveles definidos para un antígeno cualquiera, el animal recibirá una vacuna monovalente que contenga solamente ese antígeno.

c. Tratamiento de las muestras de suero

30 En la fecha de reclutamiento, son obtenidos aproximadamente cinco (5) ml de sangre de la yugular (u otra vena periférica) antes de la vacunación. Es usada una mitad (0,5) ml de sangre completa para ensayar en cuanto a la presencia de antígeno de FELV y anticuerpo de FIV usando un estuche de ensayo ELISA de combinación estándar, y los resultados son registrados en el impreso del examen físico del animal. El resto de la sangre es recogido en un tubo separador de suero de 7 ml (parte superior roja) y se permite que coagule. Si los resultados del ensayo ELISA de FELV y FIV son negativos y se confirma que el gato cumple los criterios de inclusión, entonces las muestras de sangre son centrifugadas y seguidamente el suero es separado y dividido en partes alícuotas en dos tubos de transporte de plástico (repeticiones A y B). Todas las muestras de suero son almacenadas congeladas antes del transporte. Los tubos de plástico son etiquetados con el número de identificación del animal, la ID repetida y la fecha de recogida. Son completados los impresos de envío del laboratorio (suministrados por el laboratorio) y los impresos de cadena de custodia para cada envío de muestra.

45 Las muestras congeladas (repetición A) son transportadas, sobre hielo seco, semanalmente, a un laboratorio pre-determinado. Tras la confirmación de la recepción de la muestra primaria, serán transportadas también sobre hielo muestras de seguridad (repetición B) al laboratorio participante. El laboratorio es ocultado en el historial de vacunación del animal. Son registradas las fechas de recogida de muestras de sangre y vacunación son registradas.

50 Es identificado un laboratorio para analizar todas las muestra serológicas. El laboratorio estandarizará y validará todos los ensayos para que cumplan los requisitos reguladores antes del inicio del análisis de muestras.

d. Recogida y tratamiento de muestras

55 1. Se recogen aproximadamente 5 ml de sangre en un tubo de vacunación separador de suero (parte superior roja). La sangre puede ser recogida mediante jeringuilla o directamente en el tubo de vacunación.

2. Se permite que la sangre coagule un mínimo de 20 minutos, pero no más de 40 minutos.

3. Se centrifuga la sangre coagulada durante un mínimo de 5 minutos a una velocidad apropiada.

60 4. Se separa el tapón de caucho rojo del tubo separador y se vierte cuidadosamente suero en un tubo de transporte de plástico. Se cierra el tubo de transporte de plástico con el tapón proporcionado, y se aplica una etiqueta con el nombre del animal, número de identificación del animal y fecha de recogida. Se congela la muestra. Si es usada un pipeta para transferir suero, debe ser usada una nueva pipeta para cada muestra.

5. La sangre debe ser tratada y congelada en las dos horas siguientes a la recogida.

e. *Títulos serológicos*

Son determinados los siguientes títulos de anticuerpos para cada muestra de suero: título neutralizante en suero (SN) de virus de panleucopenia felina; título SN de herpesvirus felino; título SN de calicivirus felino; título de aglutinación microscópica (MA) de *Chlamydia psittaci*. El laboratorio retendrá todos los sueros restantes hasta que haya tenido noticias del seguimiento del estudio.

La prioridad para el análisis de muestras es como sigue:

1. Título SN de virus de panleucopenia felina;
2. Título SN de virus de herpesvirus felino;
3. Título SN de calicivirus felino;
4. Título MA de *Chlamydia psittaci*.

f. *Revacunación de gatos T02*

Los resultados de laboratorio de los títulos en suero para cada uno están disponibles para el veterinario a los 7-10 días de trabajo a continuación de la vacunación. Los niveles de anticuerpos en suero son usados para determinar si es necesario administrar vacunas adicionales. Cuando el título de anticuerpos en suero para un antígeno viral o bacteriano disminuye por debajo del nivel mínimo, que indica una respuesta inmune, se llama por teléfono al propietario y se le advierte que su gato tiene que ser revacunado. El propietario hará regresar el gato para que sea revacunado con una vacuna monovalente que contenga ese antígeno particular. Una vez que haya sido revacunado, el gato permanecerá en el estudio, y los posteriores títulos de anticuerpos en suero, medidos para el antígeno revacunado, serán incluidos en el análisis.

g. *Enfermedad/medicación concurrente*

Los gatos pueden ser tratados con las siguientes medicaciones durante el transcurso del estudio, con un uso documentado para el fármaco incluido, dosificación, duración y razón de uso:

1. Mensual preventivo del parásito del corazón (por ejemplo, selamectina, ivermectina)
2. Mensual preventiva de pulgas por vía oral (por ejemplo, lufenuron)
3. Tratamiento tópico de pulgas (por ejemplo, selamectina, imidacloprid o pulverizaciones, gotas o polvos basados en piretroides)
4. Dietas de prescripción
5. Antihelmínticos orales (por ejemplo, pirantel, albendazol, fenbendazol)
6. Medicamentos para regular trastornos médicos subyacentes (por ejemplo, antimicrobianos, insulina, metimazol) pueden ser usados si su uso está documentado para identificar el fármaco, dosificación, duración, fechas y razón para el uso.

h. *Terminación de recogida de datos*

Los animales en los grupos de estudio T01 y T02 son sometidos a seguimiento durante aproximadamente 4 años después de acceder al estudio. La recogida de datos es terminada para un antígeno particular cuando un 80% de la población del estudio T02 ya no mantiene títulos de anticuerpos que sugieran una respuesta inmune activa. La terminación temprana del estudio se producirá cuando un 80% de la población del estudio T02 ya no mantenga títulos de anticuerpos que indiquen una respuesta inmune activa contra el virus de la panleucopenia felina.

6. *Informe de experiencias adversas*

Todos los gatos que accedieron al estudio y les fue administrada una vacuna fueron observados por el veterinario y el propietario de la mascota en cuanto a la aparición de cualesquiera indicios clínicos anormales durante los 10 días siguientes.

El director del estudio documentará cualesquiera informes de indicios clínicos inesperados o anormales hechos por el propietario/agentes y, basándose en un criterio profesional, determinará si los indicios clínicos anormales observados aconsejan un examen del animal fuera de programa.

ES 2 288 914 T3

5 En el caso de que un animal muera por cualquier razón durante el transcurso del estudio, debe ser realizada una necropsia por un veterinario o un patólogo veterinario, para determinar la causa de la muerte si es posible cuando sea apropiado a la discreción del patólogo veterinario, son recogidas muestras para un examen histopatológico y/o microbiológico y se completa y se redacta un informe a fondo de los descubrimientos macroscópicos y microscópicos.

7. Tratamiento de datos y análisis estadístico

10 En las zonas en las que los registros clínicos indican un predominio activo de la enfermedad (o los datos de los laboratorios de diagnóstico locales confirman casos activos de la enfermedad) los animales que son clasificados con un riesgo distinto de bajo y que no tienen un historial de la enfermedad específica de interés, deben ser considerados también inmunes (siendo considerado esto una evidencia de inmunidad por cuanto permanecen sanos incluso cuando son expuestos a la enfermedad específica en el medio ambiente). En la zonas con un predominio bajo (o cero) de la enfermedad, los animales de cualquier nivel de riesgo serán asignados a un estado inmune/no inmune basándose en los títulos y respuestas de anticuerpos.

20 Un animal se considera que es inmune a una enfermedad específica si el animal tiene niveles detectables de anticuerpos para esa enfermedad en el momento de tomar muestras de sangre y no tiene un historial previo de tener esa enfermedad. En otro caso, el animal es considerado en una categoría no inmune. Preferentemente, los títulos de anticuerpos que indican una respuesta inmune continuada son como sigue:

a) Título SN de virus de panleucopenia felina $\geq 1:16$;

25 b) Título SN de virus de herpesvirus felino $\geq 1:2$;

c) Título SN de galicivirus felino $\geq 1:2$;

d) Título MA de *Chlamydia psittaci* $\geq 1:8$.

30 Si un animal permanece inmune durante todo el estudio o es inmune aunque permanezca en el estudio es registrado como censado, y el tiempo hasta que ya no es inmune es registrado como su último valor de tiempo disponible. La duración de una memoria inmune adecuada es estimada mediante una duración de una ecuación de predicción de memoria inmune adecuada como se describió anteriormente.

35

(Esquema pasa a página siguiente)

40

45

50

55

60

65

ES 2 288 914 T3

Esquema de operaciones

Gatos de estudio no vacunados T01

5	SEMANA DE	ACONTECIMIENTO/ACTIVIDAD
	ESTUDIO	
10	0	Examen físico, muestra de sangre, vacuna, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
15	26±2	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
20	52±2	Examen físico, muestra de sangre, vacuna, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
25	78±2	Examen físico, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
30	104±2	Examen físico, vacuna, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
35	130±2	Examen físico, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
40	156±2	Examen físico, vacuna, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
45	182±2	Examen físico, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
	208±2	Examen físico, vacuna, historial de enfermedades, evaluación de riesgos

50

55

60

65

ES 2 288 914 T3

234±2	Examen físico, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
Gatos de estudio no vacunados T02	
SEMANA DE	ACONTECIMIENTO/ACTIVIDAD
ESTUDIO	
0	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
26±2	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
52±2	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
78±2	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
104±2	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
130±2	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
156±2	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
182±2	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
208±2	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos
234±2	Examen físico, muestra de sangre, historial de enfermedades, evaluación de riesgos

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para determinar una duración de una memoria inmune adecuada inducida por una vacuna para una enfermedad en un animal, en el que el animal es un perro o un gato, en el que el procedimiento comprende:
 - (a) seleccionar una pluralidad de animales del estudio a partir del una o más clínicas,
 - i) en que cada animal ha sido vacunado con la vacuna,
 - ii) en que el tiempo desde la fecha de la última vacunación es de al menos aproximadamente un año,
 - iii) en que el animal ha estado viviendo en un entorno sectorial durante al menos aproximadamente un año después de la fecha de la última vacunación,
 - iv) en que cada animal tiene un registro de vacunas y sanitario; y
 - v) en que cada animal ha sido evaluado en cuanto al riesgo de exposición a dicha enfermedad;
 - (b) asignar a dichos animales una categoría de riesgo según lo siguiente:
 - i) los animales son considerados de riesgo elevado o riesgo bajo basados en la exposición a otros animales o vectores de enfermedades
 - (1) los animales de riesgo bajo con mantenidos en ambiente interior y NO son expuestos a otros animales y vectores de enfermedades,
 - (2) los animales de riesgo elevado son animales que no están mantenidos en ambientes interiores y SÍ están expuestos a otros animales o vectores de enfermedades,
 - (c) asignar a cada animal un indicador de memoria inmune adecuada, en que ese indicador es un animal no inmune, un animal del primer indicador aka, o un animal inmune, un animal del segundo indicador aka, que comprende:
 - i) evaluar dichos animales en cuanto a indicios clínicos de dicha enfermedad usando observaciones y dichos registros sanitarios desde la fecha de la última vacunación,
 - ii) identificar los animales evaluados que tienen indicios de dicha enfermedad, estos son animales no inmunes, animales del primer indicador aka,
 - iii) identificar dichos animales de riesgo elevado que viven en zonas de predominio de la enfermedad y que no tienen indicios de dicha enfermedad determinados mediante registros clínicos y/o confirmación de laboratorio de casos de enfermedades en dicha zona de vida, estos son animales inmunes, animales del segundo indicador aka,
 - iv) evaluar una muestra de suero sanguíneo a partir de cada animal que no ha mostrado indicios clínicos de la enfermedad y que no es un animal de riesgo elevado que vive en una zona predominio de la enfermedad y que no tiene indicios de dicha enfermedad desde la fecha de la última vacunación,
 - v) identificar los animales que tienen una respuesta inmune celular y/o un título de anticuerpos de al menos 2, estos son animales inmunes, animales del segundo indicador aka,
 - vi) identificar los animales que no tienen respuesta inmune celular y/o un título de anticuerpos de menos de 2,
 - vii) administrar una dosis de refuerzo de la vacuna a estos animales,
 - viii) evaluar una muestra de suero sanguíneo de cada animal que ha recibido la dosis de refuerzo 3 días a 28 días a continuación de la dosis de refuerzo,
 - ix) identificar los animales que tienen una respuesta anamnésica adecuada de un aumento de al menos 4 veces del título de anticuerpos en suero, o un aumento estadísticamente significativo de la respuesta inmune celular, estos son animales inmunes, animales del segundo indicador aka,

ES 2 288 914 T3

- x) identificar los animales que no tienen una respuesta anamnésica adecuada de un aumento de 4 veces del título de anticuerpos en suero, o un aumento estadísticamente significativo de la respuesta inmune celular, estos son animales no inmunes, animales del primer indicador aka, y

5 (d) determinar la duración de la memoria inmune adecuada para dichos animales, determinando ésta a partir de una duración de una ecuación de estimación de la memoria inmune adecuada, siendo deducida dicha duración de la ecuación de estimación de la memoria inmune adecuada mediante un análisis de regresión logística del primero y el segundo indicador y el registro de administraciones de las vacunas.

10 2. Un procedimiento según el procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa final de la reivindicación 1, etapa d, comprende:

(a) determinar una fecha de reclutamiento para cada animal, en que la fecha de reclutamiento es la del comienzo de la evaluación del animal para detectar el marcador de inmunidad;

15 (b) asignar una fecha de comienzo del estudio como la fecha de reclutamiento para un primer animal de la pluralidad de animales reclutados en el estudio;

20 (c) asignar una variable X_j para cada animal como un número de días entre la fecha de comienzo del estudio y la fecha de reclutamiento del animal;

(d) asignar una variable XI para cada animal como un número de días entre la fecha de la última vacunación del animal y la fecha de reclutamiento del animal;

25 (e) determinar la duración de la memoria inmune adecuada a partir de una duración de la ecuación de estimación de la memoria inmune adecuada, en que dicha duración de la ecuación de estimación de la respuesta inmune adecuada es deducida mediante un análisis de regresión logística del primero y segundo indicadores y las variables X_j y XI .

30 3. Un procedimiento según el procedimiento de la reivindicación 2, en el que la etapa final de determinación de la etapa (e) comprende una ecuación de estimación de la memoria en la forma $\text{logit}(E) = \beta_0 + \beta_1 X_{DI} + \beta_2 X_{CV} + C_k$ en la cual:

E es un nivel de eficacia deseado;

35 X_{DI} es la duración de la memoria inmune adecuada;

X_{CV} es un valor medio de X_j ;

40 C_k es una constante que representa el efecto al azar en el modelo para tener en cuenta posible variación entre clínicas y es deducida mediante regresión logística; y

β_0 , β_1 y β_2 son constantes deducidas por regresión logística.

45 4. El procedimiento según el procedimiento de la reivindicación 3, en el que un modelo para la regresión logística para deducir los valores de C_k , β_0 , β_1 y β_2 es en la forma $\text{logit}(p) = \beta_0 + \beta_1 X_i + \beta_2 X_j + C_k$, en la cual:

$\text{logit}(p)$ es un vector que representa el estado inmune de los animales; y

50 C_k es la clínica de la que se seleccionó cada animal.

5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual

(a) el animal es un gato, y

55 (b) los gatos son considerados de riesgo elevado o riesgo bajo basándose en cuestionarios sobre exposición otros gatos o vectores de enfermedades.

6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el cual

60 (a) los animales de riesgo elevado en estas zonas son considerados inmunes si no son observados indicios clínicos de la enfermedad;

(b) todos los demás animales son considerados inmunes si:

65 (i) los títulos Ab determinados a través de neutralización de suero son:

$\geq 1:16$ para de virus de panleucopenia felina,

ES 2 288 914 T3

$\geq 1:2$ para el herpesvirus felino,

$\geq 1:4$ para el galicivirus felino,

5 (ii) los títulos Ab determinados a través de aglutinación microscópica son:

1:8 para el virus Chlamydia psittaci,

10 (c) cuando un 80% de los animales ya no son inmunes a dicho agente de enfermedad, este valor del tiempo es usado como el tiempo para el final de la inmunidad para el análisis de regresión logística (duración de la ecuación de predicción de la memoria inmune adecuada) o duración de la memoria inmune adecuada.

7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el cual

15 (a) dicho animal es un perro, y

(b) dichos perros son seleccionados entre una diversidad de clínicas veterinarias en distintas regiones geográficas. Los perros seleccionados serán vacunados al menos dos veces con la vacuna Vanguard o una vacuna competidora que tenga los mismos antígenos,

20 (c) a dichos perros se les proporcionará una dosis de refuerzo de la vacuna Vanguard aproximadamente a los 12 (9-14) meses,

25 (d) dicha clínica mantendrá registros adecuados para cada perro, y los registros documentarán la fecha de la vacunación inicial y cualesquiera casos de enfermedades y diagnósticos asociados,

(e) tras seleccionar una pluralidad de animales del estudio a partir de una o más clínicas de reclutamiento, es rellenado cuestionario por el propietario del perro describiendo el estilo de vida del perro (es decir, riesgo de enfermedades elevado a bajo),

30 (f) a dichos perros se les asigna una categoría de riesgo definida por la frecuencia de exposición a otros perros o vectores de enfermedades,

35 (g) tras recoger dicha sangre del reclutamiento, la primera muestra de sangre, son determinados los títulos de anticuerpos para todos los perros en cuanto a los antígenos de vacunas en Vanguard (CDV, CAV-2, CPI, CPV, leptospira canicola e icterohaemorrhagiae),

40 (h) después de que dicha sangre es recogida, el perro es revacunado (reforzado) y 3-7 días después es nuevamente sangrado para recoger una segunda muestra de sangre,

(i) dicha segunda muestra de sangre será analizada de forma idéntica a dicha primera muestra de sangre para cuantificar los niveles de anticuerpos,

45 (j) el estado inmune es determinado según cualquiera de los siguientes apartados:

(i) los animales clasificados como algo por encima del riesgo bajo de exposición a la enfermedad (es decir, en categorías de riesgo superior a bajo) y que hayan permanecido sanos son considerados inmunes, animales del segundo indicador aka,

50 (ii) los animales que son clasificados en categorías de riesgo de enfermedades bajo o cero y que han retenido títulos de anticuerpos residuales (véase con posterioridad) o que han respondido al refuerzo en 3-7 días y no tienen un historial de enfermedades (véase con posterioridad) serán considerados inmunes, animales del segundo indicador aka,

55 (iii) los niveles de anticuerpos que indican una inmunidad continuada, animales del segundo indicador aka, son descritos también como sigue:

(1)

60 (2) CDV SN $\geq 1:16$

(3) CPV SN $\geq 1:16$

(4) CAV-1 SN $\geq 1:16$

65 (5) CAV-2 SN $\geq 1:16$

ES 2 288 914 T3

(6) CPI SN $\geq$ 1:4

(7) Lepto. ictero $\geq$ 1:8

5 (8) Lepto. canicol $\geq$ 1:8

(k) es usada una regresión logística para determinar la duración de la inmunidad relacionando el tiempo de vacunación con el estado inmune o no inmune.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65