



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 363 444**

51 Int. Cl.:
C12Q 1/70 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07003510 .0**
96 Fecha de presentación : **09.08.2002**
97 Número de publicación de la solicitud: **1785495**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2007**

54 Título: **Detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de tejido.**

30 Prioridad: **09.08.2001 US 311213**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
04.08.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
04.08.2011

73 Titular/es: **IDEXX LABORATORIES, Inc.**
One Idexx Drive
Westbrook, Maine 04092, US
CORNELL RESEARCH FOUNDATION, Inc.

72 Inventor/es: **Huchzermeier, Roy y**
Dubovi, Edward, Joseph

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 363 444 T3

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

DESCRIPCIÓN

Detección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de tejido

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la detección de la infección del virus de la diarrea viral bovina en muestras de tejidos de animales.

Antecedentes de la invención

10 El virus de la diarrea viral bovina ("VDVB") representa actualmente una gran amenaza para la industria ganadera. Descrito por primera vez hace más de cincuenta años, se ha descubierto que este patógeno es tanto altamente virulento como de fácil propagación. Considerado un patógeno principal de los sistemas entérico, respiratorio, reproductor e inmunitario bovinos, el VDVB continúa produciendo mundialmente significativas pérdidas económicas a la industria ganadera. Se han producido brotes recientes en Canadá, Estados Unidos y en todo el mundo.

15 Clasificado como un miembro del género *Pestivirus* y de la familia *Flaviviridae*, el VDVB está estrechamente relacionado con el virus de la enfermedad de la frontera ovina ("VEF") y el virus del cólera porcino ("VCP"), estando ambos pestivirus serológicamente relacionados. La secuenciación genómica total o parcial de aislados de pestivirus ha permitido la determinación de que entre los pestivirus está presente un alto grado de conservación de secuencias. Más recientemente se han identificado variantes antigénicas del VDVB y las cepas del VDVB se han dividido en dos genotipos bien diferenciados basados en la citopatogenicidad, tipo 1 y tipo 2, que se han subdividido adicionalmente. La tecnología de clonación molecular y de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) ha determinado que la estructura general del VDVB consiste en una proteína de la cápside y tres glicoproteínas de la envoltura. El genoma del VDVB es un ARN de 12,3 kb constituido por un único marco de lectura abierta ("ORF"). El virus VEF es en sí un virus de ARN envuelto, pequeño, con polaridad de cadena positiva. Este aspecto de hebra positiva del genoma viral permite que el ARN sea infeccioso, incluso en ausencia de proteínas del virión.

25 El VDVB se propaga a través de un rebaño de un modo fecal-oral, atacando los sistemas entérico, respiratorio, reproductor e inmunitario. La carga viral necesaria para provocar infección sintomática guarda relación con el tipo y la cepa de virus VEF. Además, el VDVB tiene la capacidad de infectar fetos al atravesar la placenta, dando frecuentemente como resultado un aborto espontáneo del feto y una disminución de la fertilidad resultante entre los animales infectados. Las estrategias para controlar el VDVB varían desde prácticas de gestión más estrictas en un esfuerzo por reducir simplemente la pérdida económica, hasta elaborar procedimientos de prueba para identificar animales infectados que, aunque sean eficaces, conllevan un nivel de coste inaceptable. El fracaso de las vacunaciones en condiciones de campo para el VDVB ha aumentado la necesidad de un protocolo de prueba que ayudará a identificar y eliminar animales infectados de una manera rentable.

30 También debe tenerse en cuenta que el VDVB, al igual que otros agentes de enfermedades infecciosas, está asociado con una amplia variedad de manifestaciones clínicas, creando un desafío diagnóstico muy difícil. Las manifestaciones comunes de la infección del VDVB pueden incluir: tormentas de abortos, infertilidad, ciclos térmicos irregulares, muertes embrionarias precoces, momificación fetal, inmunodepresión, disentería, trombocitopenia e hipoplasia cerebral. Además, los estudios serológicos han mostrado que un alto porcentaje de ganado infectado con VDVB, que incluye el considerado a estar persistentemente infectado (PI), permanece clínicamente asintomático. Tales condiciones hacen imprescindible que se desarrolle una prueba fidedigna, económica y fácil de usar para ayudar en la detección de animales infectados con VDVB en rebaños de ganado.

40 El virus VEF se mantiene normalmente en un rebaño debido a la presencia de animales portadores PI inmunotolerantes. Este ganado PI está expuesto al virus *in utero*, pero puede permanecer clínicamente asintomático durante el curso de sus vidas, expulsando continuamente materias fecales y fluidos corporales con una alta concentración de virus, y representando así una amenaza de infección para otros animales mientras que permanezcan en el rebaño. El virus puede estar presente en un rebaño en más de la mitad del ganado antes de que se presenten los signos propios de un brote. Los síntomas de la enfermedad van precedidos normalmente de leucopenia y los esfuerzos de prueba hasta la fecha se han centrado en identificar este efecto.

45 Los brotes anteriores de VDVB han dado como resultado catastróficas pérdidas económicas a la industria pecuaria. Por ejemplo, en Ontario en 1993, los casos de VDVB aumentaron el 23% en menos de un año. También debe tenerse en cuenta que, aunque la asignación histórica del VDVB como un pestivirus era a través de las especies a las se descubrió por primera vez que estaba asociado (por ejemplo ganado), ahora se sabe que los pestivirus pueden atravesar barreras de especies. Esto indica que en zonas en las que los rumiantes salvajes de granja (por ejemplo, alce americano, búfalo, etc.) están expuestos a rebaños de ganado infectados, estos animales también son susceptibles de infectarse con VDVB, o alternativamente pueden actuar como una reserva de virus que puede infectar un rebaño previamente "limpio".

Se han comercializado más de ciento cincuenta vacunas para VDVB para ganaderos durante los últimos treinta años. Estas vacunas están constituidas por virus VEF vivos modificados o virus atenuados inactivados y partículas de virus. Se han producido brotes recientes del VDVB a pesar de la disponibilidad y uso de estas vacunas. Los enfoques actuales para la vacunación implican la inoculación anual repetida con vacuna para el ganado y generalmente se realizan etapas adicionales en un intento por asegurar que no nacen terneros como portadores PI. Sin embargo, para que sea posible el control eficaz del virus VEF, es esencial identificar los animales PI y sacarlos del rebaño. Se han desarrollado varios procedimientos de prueba diferentes para la detección del VDVB y/o la detección de animales infectados con VDVB. Estos procedimientos de prueba incluyen: transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa, inmunoensayo ligado a enzima (ELISA), técnicas habituales de aislamiento de virus e inmunohistoquímica (Haines y col., "Monoclonal Antibody-Based Immunohistochemical Detection of Bovine Viral Diarrhea Virus in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissues," Vet. Pathol., 29:27-32 (1992)).

Las dos técnicas de PCR y aislamiento de virus, debido a su sensibilidad inherente, pueden detectar niveles muy bajos del VDVB. Sin embargo, estos procedimientos también llevan mucho tiempo, son relativamente complejos y caros. La inmunohistoquímica en muestras de tejido, tales como muestras de biopsia de incisión en la oreja, es una técnica eficaz para detectar animales PI. Sin embargo, esta técnica lleva mucho tiempo, requiere un trabajo intenso y técnicos altamente cualificados. La tecnología ELISA, aunque algo menos sensible, es más conveniente como una herramienta diagnóstica general para detectar infección del VDVB en animales debido a que es rentable, da resultados en un corto periodo de tiempo y no requiere técnicos altamente cualificados y un laboratorio altamente especializado. Sin embargo, las pruebas de ELISA de captura de antígeno para VDVB se han basado históricamente en el uso de extractos de glóbulos blancos del animal que va a someterse a ensayo. Los extractos de glóbulos blancos han sido necesarios debido a que las proteínas del VDVB se acumulan en concentraciones relativamente altas dentro de los glóbulos blancos de animales infectados y los procedimientos de ELISA anteriores carecían de la sensibilidad para detectar sus proteínas del VDVB diana en suero sanguíneo (Horner y col., "Comparison of an Antigen Capture Enzyme-Linked Assay with Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction and Cell Culture Immunoperoxidase Tests for the Diagnosis of Ruminant Pestivirus Infections," Vet. Microbiol., 43:75-84 (1995)). La propia preparación de extractos de glóbulos blancos lleva mucho tiempo y es relativamente cara, haciendo que cualquier prueba de ELISA dependa costosamente por sí sola de esta extracción.

Debido a que los procedimientos anteriormente mencionados para detectar infección del VDVB en animales no sólo llevan mucho tiempo, sino que frecuentemente requieren laboratorios sofisticados y técnicos altamente cualificados para completarlos, son económicamente prohibitivos para usarlos en el modo general que se requiere para la industria ganadera de hoy en día.

Más recientemente se ha desarrollado una prueba de ELISA más rápida y más rentable que detecta VDVB en muestras de suero, plasma, leche, orina o fluido mucoso usando un anticuerpo monoclonal específico para proteínas virales del VDVB o fragmentos de proteína. Véase la patente de EE.UU. número 6.174.667 y el documento WO99/15900 de Huchzermeier y col. Aunque este procedimiento representa un avance respecto a los procedimientos previamente disponibles, puede ser difícil recoger y/o manipular las muestras de suero u otros fluidos corporales.

La presente invención está dirigida a superar las deficiencias anteriores de la técnica.

Resumen de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar si un animal diana es positivo o negativo para el virus de la diarrea viral bovina. Este procedimiento implica proporcionar una muestra de tejido del animal diana. Se proporciona un sistema de ensayo que incluye: (1) un anticuerpo de captura que es un anticuerpo específico para un epítipo del virus de la diarrea viral bovina, en el que el anticuerpo de captura está inmovilizado sobre un soporte sólido y puede reconocer y unirse a una proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina o a un fragmento de proteína del mismo que contiene especificidad antigénica; (2) un anticuerpo detector que es un anticuerpo anti-virus de la diarrea viral bovina, que puede reconocer y unirse a la proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina o fragmento de proteína del mismo que contiene especificidad antigénica; y (3) un generador de señal para indicar la presencia del anticuerpo detector asociado operativamente con el antígeno del virus de la diarrea viral bovina. La muestra se analiza con el sistema de ensayo para generar un cambio en la señal si el antígeno del virus de la diarrea viral bovina está presente en la muestra. La señal se compara con uno o más niveles de referencia para indicar si el animal diana es positivo o negativo para virus de la diarrea viral bovina.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para detectar infección del virus de la diarrea viral bovina en un bovino. Este procedimiento implica proporcionar una muestra de tejido del bovino, poner en contacto la muestra con un reactivo específico para la proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina y analizar a partir de la muestra si el reactivo específico para la proteína gp48 del virus de la diarrea viral se une a una proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina o fragmento de proteína del mismo que conserva especificidad antigénica.

El procedimiento tradicional para detectar animales infectados con VDVB, que incluye vehículos persistentemente infectados (PI), ha sido a través del uso de procedimientos de aislamiento de virus. Sin embargo, los inmunoensayos para detectar antígeno viral de VEF representan un medio rentable alternativo para detectar infección del VDVB, pueden dar resultados en un corto periodo de tiempo (minutos u horas, por ejemplo) y no requieren técnicos altamente cualificados y un laboratorio altamente especializado.

Los inmunoensayos de captura de antígeno para la detección de antígenos del VDVB han usado predominantemente muestras de sangre, o extractos de glóbulos blancos, que normalmente requieren un procedimiento de preparación de la muestra que lleva tiempo y de trabajo intenso, o más recientemente suero. Los virus VEF y los antígenos del VDVB son ubicuos por todo el cuerpo de un animal infectado, particularmente un animal portador PI, y, por tanto, también pueden aislarse de una variedad de tejidos dentro del animal. Los inmunoensayos de captura de antígeno para la detección de antígeno del VDVB en muestras de tejido han utilizado el antígeno viral P80 como diana y han utilizado un largo procedimiento de preparación de la muestra para aislar y solubilizar el antígeno viral P80 de las muestras de tejido. El antígeno viral P80 era el antígeno diana de elección debido a que se sabía que estaba presente en concentraciones suficientemente altas para poder detectarse mediante inmunoensayo dentro de las células de animales infectados con VDVB. Los procedimientos de tejido previos han implicado tratar la muestra con un tampón que contiene un agente lisogénico celular, normalmente un detergente tal como NP-40, seguido por incubación durante aproximadamente 2 horas, y luego una o dos centrifugaciones para clarificar el extracto.

Por el contrario, la presente invención utiliza un inmunoensayo de captura de antígeno específico para el antígeno viral gp48 y un procedimiento mucho más rápido y más sencillo para aislar y solubilizar el antígeno viral que no requiere tratamiento de la muestra con un agente lisogénico celular. Por tanto, la presente invención representa un medio más rápido, más sencillo y más rentable para probar muestras de tejido y el primer medio informado para probar células raspadas de la piel para antígeno del VDVB para detectar animales infectados con VDVB.

Los procedimientos de inmunoensayo previos que utilizan sangre o suero no pudieron usarse de manera fidedigna para probar animales jóvenes de menos de 3 meses de edad debido a la interferencia potencial de los anticuerpos maternos. Por el contrario, la presente invención puede usarse en ciertos tipos de muestra de tejido (por ejemplo biopsia de incisión en la oreja y raspado de la piel) como un medio fidedigno para probar animales jóvenes de menos de 3 meses de edad para determinar la presencia del VDVB. Estas muestras contienen el antígeno del VDVB, pero no contienen suficientes niveles de anticuerpo materno para interferir con la prueba.

El procedimiento de la presente invención tiene fiabilidad mejorada en comparación con las pruebas de ELISA anteriores y describe una concordancia excelente cuando se compara con los procedimientos de referencia convencionales y establecidos de detección del VDVB - aislamiento viral e inmunohistoquímica. El procedimiento de la presente invención es fácil de usar, fidedigno, rápido y rentable. Además, el procedimiento de la presente invención ayudará a veterinarios en sus esfuerzos por identificar animales infectados con VDVB, especialmente animales PI, y sacarlos de un rebaño dado. A su vez, esto protege la industria ganadera de la pérdida significativamente económica debido al VDVB. Debido a que el VDVB puede afectar a otros rumiantes, este procedimiento puede usarse en poblaciones de animales salvajes (por ejemplo ciervo, alce americano, alce) para determinar si son positivos para VDVB. Como resultado, las poblaciones de animales salvajes pueden controlarse para ayudar en la eliminación de reservas de virus VDVB fuera de la población ganadera doméstica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar si un animal diana es positivo o negativo para virus de la diarrea viral bovina. Este procedimiento implica proporcionar una muestra de tejido del animal diana. Se proporciona un sistema de ensayo que incluye: (1) un anticuerpo de captura que es un anticuerpo específico para un epítipo del virus de la diarrea viral bovina, en el que el anticuerpo de captura está inmovilizado sobre un soporte sólido y puede reconocer y unirse a una proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina o a un fragmento de proteína del mismo que conserva especificidad antigénica; (2) un anticuerpo detector que es un anticuerpo anti-virus de la diarrea viral bovina, que puede reconocer y unirse a la proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina o un fragmento de proteína del mismo que contiene especificidad antigénica; y (3) un generador de señal para indicar la presencia del anticuerpo detector asociado operativamente al antígeno del virus de la diarrea viral bovina. La muestra se analiza con el sistema de ensayo para generar un cambio en la señal si el antígeno del virus de la diarrea viral bovina está presente en la muestra. La señal se compara con uno o más niveles de referencia para indicar si el animal diana es positivo o negativo para virus de la diarrea viral bovina.

La presente invención también se refiere a un procedimiento para detectar infección del virus de la diarrea viral bovina en un bovino. Este procedimiento implica proporcionar una muestra de tejido del bovino, poner en contacto la muestra con un reactivo específico para la proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina y analizar a partir de la muestra si el reactivo específico para la proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina se une a una proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina o fragmento de proteína del mismo que contiene especificidad antigénica.

La presente invención puede llevarse a cabo con un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal.

La producción de anticuerpos monoclonales puede verse afectada por técnicas que son bien conocidas en la técnica. Básicamente, el procedimiento implica obtener en primer lugar células inmunes (linfocitos) del bazo de un mamífero (por ejemplo, ratón) que previamente se ha inmunizado con el antígeno de interés o in vivo o in vitro. Los linfocitos que secretan anticuerpos se fusionan entonces con células de mieloma (de ratón) o células transformadas que pueden replicarse indefinidamente en cultivo celular, produciéndose así una línea celular inmortal que secreta inmunoglobulina. Se cultivan las células fusionadas resultantes, o hibridomas, y las colonias resultantes se examinan para la producción de los anticuerpos monoclonales deseados. Se clonan las colonias que producen tales anticuerpos y se hacen crecer o in vivo o in vitro para producir grandes cantidades de anticuerpo. Una descripción de la base teórica y la metodología práctica de fusionar tales células se expone en Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975), que se incorpora en su totalidad a este documento como referencia.

Los linfocitos inmunitarios se producen mediante inmunización in vivo del animal (por ejemplo, un ratón) con la proteína o polipéptido de interés. Tales inmunizaciones se repiten cuanto sea necesario en intervalos de hasta varias semanas para obtener un título suficiente de anticuerpos. Tras el último refuerzo de antígenos, los animales se sacrifican y se extraen las células del bazo.

La fusión con células de mieloma de mamífero u otros componentes de fusión que pueden replicar indefinidamente en cultivo celular se efectúa mediante técnicas habituales y bien conocidas, por ejemplo usando polietilenglicol (PEG) u otros agentes de fusión. Véase Milstein y Kohler, *Eur. J. Immunol.*, 6:511 (1976), que se incorpora en su totalidad a este documento como referencia. Esta línea celular inmortal, que es preferentemente murina, pero que también puede derivarse de células de otras especies de mamíferos que incluyen, pero que no se limitan a ratas y seres humanos, se selecciona para ser deficiente en enzimas necesarias para la utilización de ciertos nutrientes, para poder crecer rápidamente y para tener una buena capacidad de fusión. Los expertos en la materia conocen muchas líneas celulares, y otras se describen regularmente.

También son bien conocidos los procedimientos para obtener anticuerpos policlonales. Normalmente, tales anticuerpos pueden obtenerse mediante la administración subcutánea de la proteína o polipéptido de interés a conejos blancos de Nueva Zelanda que primero han sido sangrados para obtener suero preinmune. Los antígenos pueden inyectarse a un volumen total de 100 μ l por sitio en seis sitios diferentes. Cada material inyectado contendrá polioles plurónicos de adyuvante tensioactivo sintético o gel de acrilamida pulverizada que contiene la proteína o polipéptido después de la electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Entonces, los conejos se sangran dos semanas después de la primera inyección y periódicamente se reforzaron con el mismo antígeno tres veces cada seis semanas. Entonces, 10 días después de cada refuerzo se recoge una muestra de suero. Los anticuerpos policlonales se recuperan entonces a partir del suero mediante cromatografía de afinidad usando el antígeno correspondiente para capturar el anticuerpo. Al final, los conejos se sacrifican con 150 mg/kg de pentobarbital i.v. Este y otros procedimientos para obtener anticuerpos policlonales se describen en Harlow y col. (eds), *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988), que se incorpora en su totalidad a este documento por referencia.

Después de preparar los anticuerpos, pueden marcarse con radiomarcajes, marcajes fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, marcajes activos de resonancia magnética nuclear, agentes quimioluminiscentes tales como luciferina y marcadores enzimáticos tales como peroxidasa o fosfatasa. El anticuerpo puede marcarse con tales reactivos usando técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, véase Wensel y Meares, *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, N.Y. (1983), que se incorpora en su totalidad a este documento por referencia, para técnicas que se refieren al radiomarcaje de anticuerpos. Véase también Colcher y col., "Use of Monoclonal Antibodies as Radiopharmaceuticals for the Localization of Human Carcinoma Xenografts in Athymic Mice," *Meth. Enzymol.*, 121: 802-816 (1986), que se incorpora en su totalidad a este documento por referencia.

Los animales infectados con VDVB se han identificado previamente probando sus muestras de sangre usando un procedimiento de aislamiento de virus, que sólo puede realizarse por técnicos altamente cualificados en un laboratorio altamente especializado. Recientemente se ha desarrollado como un medio alternativo para detectar antígeno del VDVB en animales infectados un inmunoensayo de captura de antígeno para suero u otras muestras de fluidos corporales que utiliza el anticuerpo monoclonal específico para el antígeno del VDVB, 15.c.5, como se describe en la patente de los EE.UU. número 6.174.667 de Huchzermeier y col., que se incorpora en su totalidad a este documento como referencia. El anticuerpo monoclonal 15.c.5 reconoce un epitopo de la glicoproteína gp48 del VDVB (alternativamente conocida como "EO" o "Erns") (Corapi y col., "Monoclonal Antibody Analysis of Cytopathic and Noncytopathic Viruses from Fetal Bovine Viral Diarrhea Virus Infections," *J. Virol.*, 62(8):2823-2827 (1988), que se incorpora en su totalidad a este documento como referencia) y se ha depositado un hibridoma de ratón conocido como VEF MAB 15.C.5 en la Colección americana de cultivos tipo, ahora en 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, con número de registro de la ATCC PTA-716.

La presente invención utiliza preferentemente un inmunoensayo de captura de antígeno para muestras de tejido y raspados de piel que emplea el anticuerpo monoclonal 15.c.5 e implica un procedimiento de preparación de muestras más sencillo, más rápido y menos caro que las técnicas convencionales de detección del VDVB.

5 En ciertas realizaciones de la presente invención, el tejido del animal diana pueden ser tejido de biopsia de piel o raspados de piel. También puede usarse tejido tomado del ganglio linfático o bazo.

Un procedimiento conveniente para obtener un tejido adecuado para probar el VDVB es cortar un trozo aproximado de tejido de 1 cm² de tamaño del borde de la oreja de un animal. Comercialmente están disponibles herramientas de incisión de la oreja que pueden utilizarse para este fin. Para la prueba del VDVB también son adecuados trozos de tejido que se quitan rutinariamente de animales para otros fines (por ejemplo trozos de cola).

10 Otro procedimiento conveniente para obtener un tejido adecuado para probar el VDVB es raspar células de la superficie de la piel de un animal. Esto puede realizarse mediante raspado repetido de la superficie de la piel con una herramienta similar a una espátula roma (por ejemplo palillo aplicador de madera). Alternativamente puede frotarse repetidamente un bastoncillo de algodón sobre la piel del animal.

15 La muestra de tejido puede proporcionarse suspendiendo el tejido en un disolvente tal como un tampón diluyente que no contenga agentes lisogénicos celulares (tales como detergentes) para solubilizar alguna proteína gp48 del VDVB o fragmento de la misma. El sobrenadante se ensaya entonces para determinar la presencia del antígeno viral gp48. El volumen de la muestra requerido para los fines de este sistema de ensayo es al menos de 100 µl por pocillo. El procedimiento de la presente invención puede usarse en terneros jóvenes, que es una ventaja respecto al ELISA en suero.

20 El sistema de ensayo de la presente invención emplea preferentemente un anticuerpo monoclonal específico para el antígeno del VDVB como el anticuerpo de captura, con un anticuerpo anti-VDVB policlonal de cabra como anticuerpo detector y un anticuerpo anti-cabra con peroxidasa de rábano picante como conjugado. Los resultados de la prueba pueden determinarse mediante el uso de un espectrofotómetro de microplaca en el que se lee una densidad óptica a 450 nanómetros.

25 El inmunoensayo de tejido del VDVB puede ser o un inmunoensayo de tipo sándwich, que emplea un anticuerpo específico para gp48 (como un anticuerpo de captura o detector) y otro anticuerpo específico para gp48 (como un anticuerpo detector o de captura para complementar al primer anticuerpo específico para gp48), o un inmunoensayo de tipo competitivo, que emplea un anticuerpo específico para gp48 con un antígeno de gp48 marcado o un antígeno de gp48 unido a una fase sólida.

30 Son posibles una variedad de configuraciones y formatos para cada tipo de inmunoensayo. El anticuerpo de captura puede unirse, por ejemplo, a una variedad de diferentes fases sólidas para hacer posible el lavado de los reactivos de ensayo no reaccionados durante el transcurso del ensayo. Éstas incluyen: micropocillos, tubos de ensayo recubiertos, partículas magnéticas recubiertas, varitas o palos y membranas (nitrocelulosa y otras).

35 El anticuerpo de captura, también denominado en lo sucesivo anticuerpo primario, puede unirse mediante adsorción pasiva, acoplamiento covalente o mediante el uso de una fase sólida previamente recubierta con un ligante secundario tal como proteína A, proteína G, un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo primario, avidina o un anticuerpo específico para un ligando particular (es decir: biotina, dinitrofenol, fluoresceína y otros). En el caso de avidina o cualquiera de los anticuerpos específicos para ligando, es necesario unir covalentemente el ligando al anticuerpo de captura.

40 Para un ensayo de tipo competitivo, el antígeno de gp48 puede unirse a una fase sólida mediante adsorción pasiva, acoplamiento covalente o mediante el uso de una fase sólida previamente recubierta con un ligante secundario tal como avidina, un anticuerpo específico para un ligando particular tal como dinitrofenol, fluoresceína y otros. En el caso de avidina o cualquiera de los anticuerpos específicos para ligando, es necesario unir covalentemente el ligando al antígeno de gp48.

45 Puede emplearse una variedad de marcajes (generadores de señal) en inmunoensayos de tipo sándwich o competitivos, que incluyen: enzimas tales como peroxidasa, peroxidasa de rábano picante o fosfatasa alcalina; fluoróforos tales como fluoresceína y rodamina; sondas quimioluminiscentes tales como un éster de acridinio o luciferina; una sonda resuelta en el tiempo tal como un quelato de europio; especies radiactivas tales como ¹⁴C, ³H, ³⁵S, ¹²⁵I, ³²P o ¹³¹I; o partículas tales como oro coloidal, látex estándar o látex teñido.

50 Los procedimientos para marcar anticuerpos con isótopos radiactivos son generalmente conocidos en la técnica. Los procedimientos de marcaje con tritio se describen en la patente de los EE.UU. número 4.302.438, que se incorpora en su totalidad a este documento como referencia. Los procedimientos de yodación, marcaje con tritio y marcaje con ³⁵S especialmente adaptados para anticuerpos monoclonales murinos se describen por Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, páginas 124-126, N.Y. Academic Press (1983) y la bibliografía

citada en el mismo, que se incorporan en su totalidad a este documento como referencia. Otros procedimientos para yodar anticuerpos se describen por Hunter y Greenwood, *Nature*, 144:945 (1962); David y col., *Biochemistry*, 13:1014-1021 (1974) y las patentes de los EE.UU. números 3.867.517 y 4.376.110, que se incorporan en su totalidad a este documento por referencia.

5 Los anticuerpos marcados con fluoróforos y cromóforos pueden prepararse a partir de restos patrón conocidos en la técnica. Debido a que los anticuerpos y otras proteínas absorben luz que tiene longitudes de onda de hasta aproximadamente 310 nm, los restos fluorescentes deben seleccionarse para tener absorción sustancial a longitudes de onda superiores a 310 nm y preferentemente superiores a 400 nm. Una variedad de agentes que fluorescen y cromóforos adecuados se describen por Stryer, *Science*, 162:526 (1968) y Brand y col., *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868 (1972), que se incorporan en su totalidad a este documento como referencia. Los anticuerpos pueden marcarse con grupos cromóforos fluorescentes mediante procedimientos convencionales tales como aquellos descritos en las patentes de los EE.UU. números 3.940.475, 4.289.747 y 4.376.110, que se incorporan en su totalidad a este documento por referencia.

15 Un grupo de agentes que fluorescen que tienen varias de las propiedades deseables descritas anteriormente son los colorantes de xanteno, que incluyen las fluoresceínas derivadas de 3,6-dihidroxi-9-henilxantidrol y resaminas y rodaminas derivadas de 3,6-diamino-9-fenilxantidrol y lisamina rodamina B. Los derivados de rodamina y fluoresceína de 9-o-carboxifenilxantidrol tienen un grupo 9-o-carboxifenilo. Están fácilmente disponibles los compuestos de fluoresceína que tienen grupos de acoplamiento reactivo tales como grupos amino e isotiocianato tales como isotiocianato de fluoresceína y fluorescamina. Otro grupo de compuestos fluorescentes son las naftilaminas, que tienen un grupo amino en la posición α o β .

Los anticuerpos pueden marcarse con fluorocromos o cromóforos mediante los procedimientos descritos por Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 208-249, N.Y. Academic Press (1983).

25 El anticuerpo monoclonal específico para gp48 o el anticuerpo anti-VDVB puede o marcarse directamente mediante acoplamiento covalente o mediante un anticuerpo secundario marcado que es específico para el anticuerpo primario correspondiente y puede usarse sin la necesidad de modificar químicamente el anticuerpo primario. También puede emplearse un ligante secundario marcado tal como avidina o un anticuerpo marcado específico para un ligando particular (es decir, dinitrofenol, fluoresceína y otros). En el caso de avidina o cualquiera de los anticuerpos específicos para ligando, es necesario unir covalentemente el ligando correspondiente al anticuerpo primario.

30 Para un ensayo de tipo competitivo, el antígeno de gp48 puede marcarse directamente mediante acoplamiento covalente o puede emplearse un ligante secundario marcado tal como avidina o un anticuerpo marcado específico para un ligando particular (es decir, dinitrofenol, fluoresceína y otros). En el caso de avidina o cualquiera de los anticuerpos específicos para ligando, es necesario unir covalentemente el ligando correspondiente al antígeno de gp48.

35 En otra realización de la presente invención, el sistema de ensayo incluye una cantidad del anticuerpo de captura suficiente para optimizar la detección de la proteína gp48 del VDVB o el fragmento de proteína de la muestra tomada del animal diana. Además, la concentración de anticuerpo detector, el conjugado anti-cabra particular y su concentración, la formulación del tampón diluyente reactivo, la formulación del reactivo de unión no específica (NSB) y el tipo de micropocillo puede optimizarse para dar el fondo más bajo y la relación señal a ruido más alta. Además, la configuración del reactivo (es decir, concentrados 10x de reactivo detector, reactivo de conjugado de enzima y reactivo NSB, con un tampón diluyente reactivo por separado) puede designarse para maximizar la estabilidad del kit y la caducidad.

45 Puede añadirse una pequeña cantidad de gammaglobulina bovina al tampón diluyente reactivo usado para preparar disoluciones de trabajo de anticuerpo detector y conjugado de enzima. Como resultado, la señal de fondo se reduce significativamente.

Además, es ventajoso utilizar un anticuerpo monoclonal purificado en vez de una preparación de ascitis bruta para el recubrimiento de pocillos para asegurar la consistencia entre lotes de microplacas recubiertas. El problema de la alta señal de fondo cuando se purifica 15.c.5 en pocillos puede paliarse mediante la adición de albúmina bovina al 15.c.5 purificado antes del revestimiento de pocillos.

50 El procedimiento de ELISA se lleva a cabo a temperatura ambiente y tarda aproximadamente 4 horas, aunque no requiere laboratorios altamente especializados.

55 Con respecto a los componentes del kit de prueba, cada kit contiene un control negativo y un control positivo. Estos controles se incluyen dentro de cada serie para asegurar que cada serie es válida y va a usarse en el cálculo de reducción de datos (para "normalizar" los resultados de las muestras). Estos controles, además de todos los otros reactivos usados en el ensayo, se conservan con la adición de timerosal.

5 Para minimizar los volúmenes de recipiente necesarios y maximizar la estabilidad del kit, el reactivo detector, el reactivo conjugado de enzima, el reactivo que inhibe la unión no específica (por ejemplo, el reactivo "NSB") y el tampón de lavado de ELISA pueden suministrarse como concentrados 10x. El tampón diluyente reactivo, el control negativo, el control positivo, el reactivo de sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) y una disolución que detendrá la reacción (la disolución de parada) pueden suministrarse en el kit en una forma fácil de usar sin necesidad de dilución. Las muestras se realizan en una de las dos bandejas de 96 pocillos proporcionadas en el kit.

Otros compuestos o fuentes necesarias para realizar el sistema de ensayo de antígeno del VDVB incluyen, entre otras cosas: agua desionizada, un lector de microplaca que puede hacer una lectura de la densidad óptica (DO) a 450 nm, pipetas serológicas y pipeteadores de precisión.

10 **Ejemplos**

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar realizaciones de la presente invención, pero ni mucho menos pretenden limitar su alcance.

Ejemplo 1 - Composiciones reactivas

15 Los compuestos que comprenden el tampón de lavado de ELISA son: Tris HCl 0,1M (6,25 normal) para ajuste de pH; 0,001% de timerosal (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO); y 0,5% de Tween 20.

Los compuestos que comprenden el concentrado 10x de reactivo detector son: 25% de etilenglicol; 0,01% de timerosal; aproximadamente el 5% de anticuerpo anti-BVD de cabra; y 0,06% de colorante alimentario amarillo en PBS (pH 7,4).

20 Los compuestos que comprenden el concentrado 10x de reactivo NSB son: 25% de etilenglicol, 0,01% de timerosal, 0,2% de IgG de ratón y 0,06% de colorante alimentario rojo en PBS (pH 7,4).

Los compuestos que comprenden el tampón diluyente reactivo son: 2,5% de albúmina de suero bovino, 0,01% de timerosal, 0,625% de Igepal CA-630 (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) y 2 μ g/ml de gammaglobulina bovina en PBS (pH 7,4).

25 El sustrato de tetrametilbenzidina (TMB) está comercialmente disponible. Los proveedores de este sustrato incluyen: BioFX Laboratories (Owings Mills, MD), Pierce Chemical Co. (Rockford, Illinois) y Kirkegaard & Perry Laboratories (Gaithersburg, MD).

La disolución de parada consiste en una formulación ácida. Puede comprarse normalmente como un reactivo listo para usar de BioFX Laboratories (Owings Mills, MD).

30 Cada bandeja de 96 pocillos se recubre durante la noche con 0,1 ml por pocillo de una disolución que contiene el anticuerpo anti-VDVB tal como 15.c.5 purificado (disponible a través de Diagnostic Laboratory en el Colegio de Medicina Veterinaria, Cornell University, Ithaca, Nueva York) a 5 μ g/ml y albúmina de suero bovino a 10 μ g/ml en tampón carbonato (pH 9,6). Tras el recubrimiento, cada bandeja se lava tres veces con tampón de lavado de ELISA y se deja secar durante la noche a 4°C. Se usa una bolsa de papel de aluminio para envolver cada bandeja después del secado, y dentro de cada bolsa se incluye un desecante para eliminar la humedad.

35 Los compuestos que comprenden el concentrado 10x de reactivo de conjugado de enzima son: 25% de etilenglicol, 0,01% de timerosal, anticuerpo anti-cabra conjugado al mecanismo de detección, normalmente peroxidasa de rábano picante (dilución de aproximadamente 1 a 700), 0,1% de albúmina de conejo y 0,02% gammaglobulina de conejo en PBS (pH 7,4).

40 Los compuestos que comprenden el control negativo para el kit de ensayo son 1% de Igepal CA-630 y 0,01% de timerosal en PBS (pH 7,4).

Los compuestos que comprenden el control positivo para el kit de ensayo son 1% de Igepal CA-630, 0,01% de timerosal, 1% de albúmina de suero bovino, cultivo del VDVB (diluido apropiadamente) y 50 μ M de fenil metil sulfonil fluoruro en PBS (pH 7,4).

Ejemplo 2 - Protocolo de ELISA

45 Para realizar el ELISA, el usuario debe emplear el número necesario de micropocillos de una o más de las placas de 96 pocillos proporcionadas. Los propios micropocillos pueden sacarse de las placas proporcionadas, cualquier pocillo en exceso debe guardarse para futuros ensayos. Los pocillos se humedecen previamente mediante pipeteo de 0,2 ml de tampón de lavado de ELISA en cada pocillo; este tampón debe eliminarse luego o verterse de los pocillos antes de la adición de muestra. Al igual que en cada una de las etapas de lavado, es importante que todo el
50 tampón de lavado de ELISA añadido a los pocillos se elimine, también asegurándose a la vez que los pocillos no se

secan entre etapas. A partir de entonces se pipetea 100 µl de muestra o control en cada pocillo.

Después de la adición de la muestra o control, los pocillos se cubren con película transparente autoadhesiva cortada al tamaño apropiado y los pocillos se incuban a temperatura ambiente durante de 1 a 1,5 horas. Entonces, el reactivo detector de trabajo debe prepararse mediante mezclado de 1 parte del concentrado 10x de reactivo detector, 1 parte de concentrado 10x de reactivo NSB y 8 partes de tampón diluyente reactivo. El reactivo detector de trabajo debe prepararse en el plazo de aproximadamente 1 hora antes de uso y almacenarse a 4°C.

Después del periodo de incubación, el líquido se elimina de los pocillos como se describe anteriormente y los pocillos se lavan mediante adición de 0,2 ml de tampón de lavado de ELISA a cada pocillo y luego se elimina o se vierte el tampón de lavado de ELISA. Este procedimiento de lavado debe repetirse dos veces más para dar un total de tres lavados. Después de esta etapa, en cada micropocillo de muestra y control deben pipetarse 0,1 ml de reactivo detector de trabajo. Los pocillos se cubren con la película adhesiva y se incuban a temperatura ambiente durante de 1 a 1,5 horas. Durante este tiempo, el reactivo de conjugado de enzima de trabajo debe prepararse mediante mezclado de 1 parte de concentrado 10x de conjugado de reactivo de enzima, 1 parte de concentrado 10x de reactivo NSB y 8 partes de tampón diluyente reactivo. El reactivo de conjugado de enzima de trabajo debe prepararse en el plazo de aproximadamente 1 hora antes de uso y almacenarse a 4°C. Después del periodo de incubación, el líquido de los pocillos se elimina como se describe anteriormente y los pocillos se lavan un total de tres veces como se describe anteriormente. A partir de entonces se pipetea 0,1 ml de reactivo de conjugado de enzima de trabajo en cada micropocillo. Cuando esto se realiza, los pocillos se cubren con película adhesiva y se incuban a temperatura ambiente durante de 1 a 1,5 horas. Mientras se lleva a cabo esta incubación, el reactivo de sustrato de TMB y la disolución de parada se recuperan y se deja que se equilibren a temperatura ambiente o permanecen a temperatura ambiente.

Después del periodo de incubación, el líquido se elimina de los pocillos y los pocillos se lavan un total de tres veces, como se describe anteriormente. En cada micropocillo se pipetea 0,1 ml de reactivo de sustrato de TMB. Para evitar la contaminación del sustrato de TMB se recomienda verter la cantidad de TMB que va a usarse de su botella a un recipiente separado para pipetear y que el TMB restante se deseche en vez de devolverse a su recipiente original. Después de poner el reactivo de sustrato de TMB en los pocillos, los pocillos se cubren y se incuban a temperatura ambiente en la oscuridad durante de 10 a 12 minutos. Después de este periodo de incubación, en cada micropocillo se pipetea 0,1 ml de disolución de parada y los pocillos se incuban de nuevo a temperatura ambiente en la oscuridad durante de 5 a 10 minutos. Una vez completada esta incubación final, la absorbancia de cada pocillo se determina a 450 nm frente a un blanco de aire o agua en un lector de microplaca u otro espectrofotómetro adecuado.

Con respecto al protocolo anterior, debe tenerse en cuenta que para asegurar la exactitud y calidad de los resultados conseguidos, en cada serie de ELISA deben incluirse los dos controles positivo y negativo. El kit de prueba de antígeno del VDVB debe almacenarse a 2-8°C con el fin de mantener su caducidad y eficacia mientras sea posible.

Ejemplo 3 – Reducción de datos de ELISA

Los datos se reducen calculando en primer lugar la DO bruta promedio (densidad óptica) para cada control y muestra ensayada. El valor de DO promedio obtenido para el control negativo se resta entonces de cada uno de los otros valores de DO bruta promedio para obtener valores de DO corregidos con el blanco para el control positivo y las muestras correspondientes. Esta etapa elimina el ruido de fondo (debido a la unión no específica del conjugado de enzima) de la señal específica. Entonces, para cada muestra se calcula una DO "normalizada" dividiendo la DO corregida con el blanco de esa muestra entre la DO "corregida con el blanco" del control positivo. Mediante la normalización de los resultados de esta manera disminuye enormemente la variación de serie a serie. Los valores de DO normalizados así obtenidos se comparan con las siguientes pautas (tabla 1) para determinar el estado del VDVB del animal.

Tabla 1. Tabla de densidad óptica para la determinación del estado del VDVB

| Valores de DO "normalizados" | Estado del VDVB |
|------------------------------|--------------------|
| Inferiores a 0,20 | NEGATIVO para VDVB |
| 0,20 a 0,39 | "Zona gris" |
| Superiores a 0,39 | POSITIVO para VDVB |

Con respecto a la comparación anterior, si se obtiene una DO "normalizada" que está dentro de la "zona gris", la muestra tiene que volver a ensayarse usando los reactivos de trabajo patrón que se usaron previamente y también se ensaya sin anticuerpo detector en el reactivo de anticuerpo detector de trabajo.

- 5 La DO bruta obtenida sin detector debe restarse de la DO bruta obtenida con detector; entonces, esta diferencia debe dividirse entre la DO con blanco del control de kit positivo (la DO del control de kit negativo debe usarse como siempre para poner en blanco el control de kit positivo). Un nuevo valor normalizado inferior a 0,2 debe considerarse negativo para VDVB, un nuevo valor de DO normalizada de 0,2 o superior debe considerarse positivo para VDVB.

Ejemplo 4 - Control de calidad

- 10 Con el fin de mantener datos consistentemente fidedignos, los valores de DO bruta (por ejemplo, sin blanco) obtenidos para el kit - con respecto a los controles positivos y negativos - deben caer dentro de los intervalos observados en la tabla 2.

Tabla 2. Patrones de densidad óptica sin blanco para la fiabilidad

| Valores de DO bruta | |
|----------------------------|-------|
| Control negativo | < 0,5 |
| Control positivo | > 0,8 |

Ejemplo 5 – Análisis del VDVB

- 15 Se analizaron incisiones en la oreja de 100 animales en el ELISA de captura de antígeno para VDVB (ACE) y los resultados se compararon con pruebas de referencia realizadas en los mismos animales (aislamiento de virus, PCR o inmunoensayo de captura de antígeno en sangre, o inmunohistoquímica en una incisión en la oreja fijada por separado). Treinta y nueve de los animales objeto fueron positivos para VDVB y sesenta y uno fueron negativos para VDVB mediante un procedimiento de referencia. Los animales sujeto oscilaron en edad de 1 día a adultos. La correlación entre los resultados de incisión en la oreja/ACE y los resultados de referencia fue excelente.
- 20

Tabla 3. Comparación de diferentes procedimientos de análisis del VDVB

| | <u>Resultados de incisión en la oreja /ACE</u> | | |
|---------------------------------------|--|-----------------|--------------|
| | <u>Positivo</u> | <u>Negativo</u> | <u>Total</u> |
| <u>Procedimiento de referencia</u> | | | |
| <u>Positivo</u> | 39 | 0 | 39 |
| <u>Negativo</u> | 0 | 61 | 61 |
| <u>Total</u> | 39 | 61 | 100 |
| Sensibilidad relativa = 39/39 = 100% | | | |
| Especificidad relativa = 61/61 = 100% | | | |

- 25 Debido a que una infección aguda del VDVB puede dar como resultado la producción de antígenos virales durante un corto periodo de tiempo, un resultado positivo para VDVB en el ELISA puede no siempre ser indicativo de un animal persistentemente infectado. Un diagnóstico definitivo de que un animal particular está persistentemente infectado sólo debe hacerse después de que se tome una segunda muestra del animal sujeto al menos 3 semanas después de la muestra inicial, y se encuentre que esa segunda muestra también es positiva para VDVB.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento in vitro para detectar en una muestra de tejido a partir de una incisión en la piel de la oreja de un bovino, ya sea el bovino positivo o negativo para el virus de la diarrea viral bovina, que comprende:
- 5 a) frotar repetidamente un hisopo de algodón por la incisión en la piel de la oreja para obtener una muestra de tejido;
- b) suspender la muestra de tejido en un disolvente en condiciones efectivas para solubilizar cualquier proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina o fragmento de proteína del mismo sin lisar las células;
- c) proporcionar un sistema de ensayo que comprende:
- 10 1) un anticuerpo de captura monoclonal que es un anticuerpo específico para un epítipo del virus de la diarrea viral bovina, estando inmovilizado dicho anticuerpo de captura sobre un soporte sólido y que puede reconocer y unirse a una proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina o fragmento de proteína del mismo que conserva especificidad antigénica; y
- 15 2) un anticuerpo detector que es anticuerpo anti-virus de la diarrea viral bovina, que puede reconocer y unirse a dicha proteína gp48 del virus de la diarrea viral bovina o fragmento de proteína del mismo que conserva especificidad antigénica; y
- 20 3) un generador de señal para indicar la presencia de dicho anticuerpo detector asociado operativamente al antígeno del virus de la diarrea viral bovina;
- d) analizar dicho disolvente en el que la muestra de tejido de la piel de la incisión en la oreja se suspende con dicho sistema de ensayo para generar un cambio en la señal si el antígeno del virus de la diarrea viral bovina está presente en la muestra; y
- e) comparar la señal con uno o más niveles de referencia para indicar si el bovino es positivo o negativo para virus de la diarrea viral bovina.
- 2.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo específico para un epítipo del virus de la diarrea viral bovina es el anticuerpo monoclonal designado como 15.c.5.
- 25 3.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo detector es un anticuerpo policlonal.
- 4.- El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo detector es un anticuerpo monoclonal.