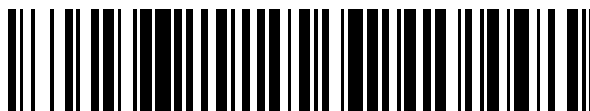


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 421 543**

51 Int. Cl.:

C12N 7/08 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.06.2006** **E 06774559 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2013** **EP 1904627**

54 Título: **Método para la preparación de virus y proteínas del PRRS, y kits de pruebas de diagnóstico para su detección**

30 Prioridad:

05.07.2005 US 175605

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
03.09.2013

73 Titular/es:

**REGENTS OF THE UNIVERSITY OF MINNESOTA
(100.0%)
450 UNIVERSITY GATEWAY, 200 OAK STREET
S.E.
MINNEAPOLIS, MN 55455-2070, US**

72 Inventor/es:

**MENDE, EUGENIO P. y
JOO, HAN-SOO**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 421 543 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

Método para la preparación de virus y proteínas del PRRS, y kits de pruebas de diagnóstico para su detección

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a dispositivos y a métodos para la detección de anticuerpos que reconocen una o más proteínas y/o antígenos del virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRSV). Los anticuerpos pueden estar en un fluido biológico de un sujeto infectado o en riesgo de infectarse con el PRRSV. La invención se puede aplicar ventajosamente tanto al diagnóstico como a la prevención de la infección por PRRSV.

Antecedentes de la invención

Una de las principales causas de pérdidas económicas en la industria porcina de EE.UU. es el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) o PRRSV. El PRRSV es el agente causante de problemas de reproducción y trastornos respiratorios en cerdos. Las pérdidas económicas asociadas con el PRRS se deben principalmente a su implicación en el aborto de hembras preñadas y en el complejo respiratorio porcino (CRP) en cerdos en crecimiento. Se han puesto en práctica diferentes medidas de control, incluyendo el uso de una vacuna y cambios en la gestión. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.690.940. Sin embargo, a pesar de la vacunación rutinaria, los brotes del PRRSV en las granjas de cerdos son frecuentes.

Los brotes se deben más comúnmente a la falta de medidas en materia de bioseguridad. La baja detección de cerdas jóvenes de reposición infectadas con el PRRSV en las piaras ha sido una causa común de deficiencias en bioseguridad. Estos problemas se podrían evitar si las granjas contaran con un método sencillo y económico para analizar la infección por PRRSV. Dicho método también se puede aplicar para comprobar si las cerdas están produciendo lechones destetados negativos y durante los procedimientos de aclimatación.

Para analizar los anticuerpos contra el PRRSV, los veterinarios deben recoger muestras de sangre y enviarlas a un laboratorio de diagnóstico veterinario. En la actualidad, el ELISA, la prueba de inmunofluorescencia indirecta y el ensayo de inmunoperoxidasa en monocapa son métodos comunes de laboratorio para la detección de anticuerpos contra el PRRSV. Sin embargo, estos métodos requieren equipos costosos y técnicas de laboratorio cualificadas. Para el uso de estas técnicas, se requieren al menos 3 días, incluyendo el tiempo del envío por correo, para obtener un resultado. Además, los productores de cerdos tienen que incurrir en gastos para la recogida de las muestras y su envío a un laboratorio de diagnóstico. Una prueba de campo sencilla y rápida para la detección de anticuerpos contra el PRRSV sería muy útil en los laboratorios de las clínicas veterinarias o granjas porcinas. En general, la erradicación de la enfermedad con una vacuna contra el PRRSV no ha sido satisfactoria a nivel agropecuario. Los métodos tales como la despoblación total y la repoblación han demostrado ser eficaces para la erradicación en la granja. Sin embargo, tales métodos no se pueden usar en todas las granjas y son relativamente caros de realizar.

Por otra parte, dichos métodos dependen de la detección del PRRSV. Se han descrito las secuencias de ácidos nucleicos y proteínas codificadas de algunas cepas del PRRSV. La detección del PRRSV a través de muestras de tejido, incluyendo el tejido pulmonar, también se ha tratado (véase el documento WO 96/06619), lo que coincide con la observación de que el PRRSV se replica preferentemente en los macrófagos alveolares del pulmón. Tras la infección por vía oronasal, el PRRSV replicado en los macrófagos pulmonares continúa hasta los ganglios linfáticos pulmonares y luego hasta los diferentes órganos por el torrente sanguíneo.

La mención de los documentos en la presente memoria no pretende indicar que alguno de ellos sea técnica anterior pertinente. Todas las afirmaciones con respecto a la fecha o representación en cuanto al contenido de los documentos se basan en la información disponible para el solicitante y no constituyen admisión alguna en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de los documentos.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un método para la preparación de una composición vacunal que contiene proteínas y antígenos del virus del PRRS de células infectadas con el virus PRRS, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar una población de células infectada con el virus del PRRS;
- (b) separar dichas células infectadas del virus del PRRS libre de células para formar células aisladas que contengan proteínas y antígenos del virus del PRRS asociadas con las células; y
- (c) extraer o eluir las proteínas y los antígenos del virus del PRRS de las células aisladas con una solución que contenga detergente para producir una preparación que comprenda proteínas y antígenos del virus del PRRS; y
- (d) combinar dicho extracto o eluido con un adyuvante para formar una composición vacunal.

La presente invención también se refiere a dispositivos y métodos para la detección de la infección de un sujeto por el virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS) o PRRSV. La detección se realiza mediante el uso

de composiciones que contienen una o más proteínas y/o antígenos codificados por el PRRSV que se unen a anticuerpos contra dichas proteínas. Por lo tanto, la invención se puede considerar como aquella basada en el principio de "captura de anticuerpos" seguida de la detección de los anticuerpos. Los anticuerpos son los que están presentes en un sujeto infectado con el PRRSV, pero ausentes en individuos no infectados.

La una o más proteínas codificadas por el virus del PRRS pueden incluir la proteína de la nucleocápside (N) y/o una o más proteínas de la envoltura viral ("E"). Las proteínas también pueden ser glucoproteínas que se encuentran en la superficie de las células infectadas por el PRRSV. Las proteínas también se pueden considerar antígenos del PRRSV usados contra anticuerpos detectados en un sujeto, donde los anticuerpos reconocen las proteínas del PRRSV y, por lo tanto, el PRRSV.

La/s proteína/s y/o los antígenos del PRRSV se pueden usar ventajosamente en kits, dispositivos y métodos para detectar la infección por PRRSV en los primeros momentos, en base a la detección de anticuerpos contra el PRRSV. Dichos métodos de detección se basan en la presencia de anticuerpos, en un sujeto infectado poco tiempo después de la infección, contra al menos una proteína y/o antígenos del PRRSV según lo descrito en la presente memoria.

Las composiciones que contienen una o más proteínas y/o antígenos expresados por el PRRSV se pueden usar en la preparación o el uso de un kit o dispositivo según lo descrito en la presente memoria. El dispositivo puede ser una placa que está revestida de una composición descrita en la presente memoria. Los ejemplos no restrictivos de dichas placas incluyen placas de Petri de varios tamaños, así como los pocillos de una placa de microtitulación. La placa se puede usar en una prueba de diagnóstico para los anticuerpos contra una o más proteínas y/o antígenos del PRRSV contenidos en la composición. Por lo tanto, dichos dispositivos se pueden usar para detectar la presencia de anticuerpos contra una o más proteínas y/o antígenos del PRRSV en la composición. Los anticuerpos que se van a detectar pueden estar en una muestra de un fluido biológico, y si los anticuerpos están presentes, sirven como indicador de la infección por PRRSV en el sujeto del que se tomó la muestra. Así pues, los dispositivos se pueden usar como un medio rápido de diagnóstico de la presencia de infección por PRRSV.

En el centro de dicho dispositivo hay una forma inmovilizada de una o más proteínas y/o antígenos del PRRSV presentes en la composición. Una proteína y/o un antígeno del PRRSV se puede inmovilizar directamente, tal como por adsorción (por ejemplo, revestimiento) o por conjugación a una superficie de un dispositivo como ejemplos no restrictivos. Como alternativa, la proteína y/o el antígeno se pueden inmovilizar indirectamente, tal como mediante el uso de un agente que se una a la proteína y/o al antígeno o mediante el uso de un ligador que se una tanto a la superficie como a la proteína o al antígeno. Por lo tanto, la/s proteína/s y/o el/los antígeno/s inmovilizado/s del PRRSV se pueden considerar un "agente de captura" para la unión por un anticuerpo contra la/s proteína/s y/o el/los antígeno/s para formar un complejo inmovilizado que contenga la/s proteína/s y/o el/los antígeno/s. El "agente de captura" inmovilizado se puede considerar, por supuesto, un agente para "capturar" un anticuerpo que se una al agente.

Entonces, el complejo se puede detectar mediante el uso de un "agente detector", tal como un reactivo marcado que se una al complejo, según lo descrito en la presente memoria. Si se une a un complejo, el "agente detector" indica la presencia de anticuerpo contra el PRRSV en una muestra. En algunas realizaciones, el "agente detector" es un anticuerpo secundario marcado que se une a los anticuerpos, si están presentes en la muestra, que se han inmovilizado como parte del complejo. La presencia del anticuerpo contra el PRRSV se puede usar como indicador de la infección por PRRSV en el sujeto del que se obtuvo la muestra. La ausencia del anticuerpo contra el PRRSV indicaría la ausencia de infección. La muestra es preferentemente de un sujeto porcino, u otro sujeto sospechoso de estar infectado con el PRRSV, pero, en los dispositivos descritos en la presente memoria, se puede usar cualquier sujeto que pueda estar infectado por el PRRSV o un portador del PRRSV.

El "agente detector" se puede marcar para permitir la detección directa, tal como mediante conjugación con un marcador particulado que sea visible por el ojo humano tras una agregación suficiente. Como alternativa, el agente se puede marcar para la detección indirecta, tal como mediante conjugación con una enzima que se detecte en base a su actividad en un sustrato detectable o para producir un producto detectable. Por supuesto, el "agente detector" puede ser un "agente secundario" que se una a un agente de unión "primario" marcado o no marcado que se una al complejo.

Un dispositivo también puede contener un sitio de control o una región de control en el mismo que confirme el correcto funcionamiento del dispositivo independientemente de si los anticuerpos contra el PRRSV están presentes en una muestra aplicada al dispositivo. Dicho control se puede basar en la detección de otra entidad molecular o macromolecular presente en la muestra.

Sin quedar ligados al formato del dispositivo usado, la/s proteína/s y/o el/los antígeno/s del PRRSV, y las composiciones que los comprenden, también se pueden usar en un método de detección de anticuerpos contra la/s proteína/s y/o el/los antígeno/s del PRRSV. Dichos métodos se pueden diseñar para detectar dichos anticuerpos en un fluido biológico de un sujeto, tal como un individuo sospechoso de estar infectado con el PRRSV. El método comprende poner en contacto la muestra, o una forma diluida de la misma, con la/s proteína/s y/o el/los antígeno/s codificado/s por el PRRSV y determinar si hay algún anticuerpo en la muestra que se una a la/s proteína/s y/o al/a

los antígeno/s. La unión de un anticuerpo a una proteína y/o antígeno del PRRSV forma un complejo que se puede detectar para indicar la presencia del anticuerpo y, por lo tanto, indica la presencia de una infección por PRRSV en el sujeto del que se obtuvo la muestra. La muestra es preferentemente de un sujeto porcino, pero se puede usar cualquier sujeto que pueda estar infectado por el PRRSV o un portador del PRRSV.

La selección de fluidos biológicos que se pueden usar incluye cualquier fluido en el que los anticuerpos contra una proteína y/o un antígeno del PRRSV puedan estar presentes de manera detectable. Los ejemplos no restrictivos incluyen las secreciones corporales de un sujeto tales como sangre, suero, plasma, saliva, lágrimas, mucosidad, secreciones nasales y secreciones vaginales. Como es evidente, las diluciones de dichos fluidos también se pueden usar como la muestra en la práctica de la invención. Se puede usar un diluyente que contenga EDTA u otro quelante de cationes divalentes en una proporción de 1:1 con una muestra de fluido biológico de un sujeto. Con muestras de suero o plasma, se puede omitir la dilución.

La muestra es preferentemente de un individuo sospechoso de estar infectado con el PRRSV debido a la presencia de síntomas indicativos de una infección. Como alternativa, los métodos descritos en la presente memoria se pueden usar como parte los rastreos rutinarios de animales, tales como los de una granja para permitir la rápida identificación y el aislamiento de los individuos infectados. Los métodos también se pueden usar en casos específicos tales como antes del transporte o la transferencia de un animal de un lugar a otro para permitir la identificación de la infección y evitar la propagación de la misma. El sujeto puede ser un cerdo y, por lo tanto, la muestra puede ser de un fluido corporal o secreción de un cerdo. Los ejemplos no restrictivos de cerdos de los que se pueden obtener muestras para su uso según lo descrito en la presente memoria incluyen cerdos macho, cerdas jóvenes, cerdas, cerdos de engorde, cerdos de destete y lechones. Los cerdos pueden variar en cualquier edad desde el nacimiento hasta la muerte. Los ejemplos no restrictivos incluyen el uso de cerdos de aproximadamente 30 a aproximadamente 40, 41 a aproximadamente 50, o 51 a alrededor de 60 días o más de vida.

La presente invención proporciona un método basado en un ensayo enzimático de inmunodifusión vertical (VIDEA). El método utiliza proteína y/o antígeno del PRRSV inmovilizado que se separa por una barrera permeable de una muestra que contiene, o es sospechosa de contener, anticuerpos contra el PRRSV. Se dispone la muestra hacia la barrera a través de un material poroso, y los anticuerpos contra el PRRSV de la muestra se difunden a través de la barrera permeable, entrando en contacto con la proteína y/o el antígeno del PRRSV. El contacto entre los anticuerpos y la proteína/el antígeno produce la formación de un complejo, que posteriormente se detecta para indicar la presencia de los anticuerpos en la muestra. La detección puede ser en forma de una superficie en la que los complejos estén presentes. La barrera permeable es agar o agarosa. Por consiguiente, la invención proporciona un método de ensayo enzimático de inmunodifusión vertical (VIDEA), comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) proporcionar un dispositivo de diagnóstico que comprende al menos una superficie revestida con una o más proteínas y antígenos del virus del PRSS preparados mediante (i) el suministro de una población de células infectadas con el virus del PRRS; (ii) la separación de dichas células infectadas del virus del PRRS libre de células para formar células aisladas que contengan proteínas y antígenos del virus del PRRS asociados con las células; y (iii) la extracción o elución de las proteínas y los antígenos del virus del PRRS de las células aisladas con una solución que contenga detergente; habiendo sido dicha superficie recubierta con una capa de agar o agarosa sobre dicha al menos una superficie;
- (b) poner en contacto la superficie de agar o agarosa con un material poroso que comprenda una muestra que contenga anticuerpos obtenida de un sujeto;
- (c) incubar dicho dispositivo durante un período suficiente para permitir la difusión del material de dicha muestra a dicha uno o más superficies, teniendo lugar dicho período opcionalmente después de retirar el material poroso; y
- (d) detectar la presencia de anticuerpos en la superficie de la placa tras retirar el agar o la agarosa.

La presente invención también proporciona un método basado en un ensayo enzimático de inmunodifusión horizontal (HIDEA). El método se parece al del VIDEA descrito anteriormente en que ambos utilizan proteína y/o antígeno del PRRSV inmovilizado. El formato de HIDEA incluye la separación, por una barrera permeable, de la proteína/antígeno inmovilizado de una muestra que contiene, o es sospechosa de contener, anticuerpos contra el PRRSV. La muestra se dispone hacia la barrera directamente, de modo que los anticuerpos contra el PRRSV se difunden a través de la barrera permeable, entrando en contacto con la proteína y/o el antígeno del PRRSV. La difusión también puede irradiarse hacia fuera desde el punto de contacto de la muestra con la barrera. El contacto entre los anticuerpos y la proteína/el antígeno produce la formación de un complejo, que se puede detectar para indicar la presencia de los anticuerpos en la muestra. La detección puede ser en forma de un círculo o anillo en el que los complejos estén presentes. La barrera permeable es agar o agarosa. Por consiguiente, la invención proporciona un método de ensayo enzimático de inmunodifusión horizontal (HIDEA), comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar un dispositivo de diagnóstico que comprende al menos una superficie revestida con una o más proteínas y antígenos del virus del PRSS preparados mediante (i) el suministro de una población de células infectadas con el virus del PRRS; (ii) la separación de dichas células infectadas del virus del PRRS libre de células para formar células aisladas que contengan proteínas y antígenos del virus del PRRS asociados con las células; y (iii) la extracción o elución de las proteínas y antígenos del virus del PRRS de las

células aisladas con una solución que contenga detergente; habiendo sido dicha superficie recubierta con una capa de agar o agarosa que comprende una o más hendiduras para recibir una muestra, sobre dicha al menos una superficie;

(b) poner en contacto la una o más hendiduras con una muestra que contenga anticuerpos obtenida de un sujeto;

(c) incubar dicho dispositivo durante un período suficiente para permitir la difusión del material de dicha muestra a dicha uno o más superficies; y

(d) detectar la presencia de anticuerpos en la superficie de la placa tras retirar el agar o la agarosa.

Los diversos aspectos de la invención se contemplan para su uso en relación con todas las cepas del PRRSV que están relacionadas antigénicamente con las cepas de América del Norte. Por lo tanto, la invención se puede considerar de una manera más general como aquella basada en la/s proteína/s de cualquier virus del PRRS.

Además, en la presente memoria, se describen métodos relativos a la producción de dichos dispositivos. Por lo tanto, en la presente memoria, se describen métodos de preparación de los kits, dispositivos y métodos. Se puede usar un método de preparación de proteínas del PRRSV a partir de células infectadas con el mismo. Las proteínas se recogen poco después de la infección cuando la mayoría, o la totalidad, de las proteínas permanecen asociadas a las células infectadas. Dicho de otra manera, la mayoría o la totalidad de proteínas codificadas por el PRRSV bien están dentro de las células infectadas o asociadas a la membrana celular de las células infectadas. En dichas condiciones, relativamente pocas, si es que alguna de las partículas del PRRSV está presentes en el medio extracelular fuera de las células.

En la presente memoria, se describen métodos para la inmovilización de un primer agente de unión tal como, pero sin limitación, la proteína N y/o una o más proteínas de la envoltura del PRRSV, en al menos una superficie de un dispositivo según lo descrito en la presente memoria.

Se pueden usar kits que comprenden los dispositivos descritos en la presente memoria o para la práctica de los métodos descritos en la presente memoria. Otros aspectos adicionales incluyen composiciones y artículos de fabricación para su uso en la práctica de uno o más métodos descritos en la presente memoria. Los ejemplos no restrictivos de dichas composiciones incluyen aquellas para su uso en la preparación de un kit o dispositivo descrito en la presente memoria. Los ejemplos no restrictivos de los kits incluyen aquellos que comprenden una o más composiciones o agentes, o uno o más dispositivos, para su uso en los métodos divulgados en la presente memoria.

En la figura anexa y la descripción que se presenta a continuación se exponen los detalles de una o más realizaciones de la invención. Otras características, objetos y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la figura y la descripción detallada, así como de las reivindicaciones.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una representación esquemática de dos ensayos enzimáticos de inmunodifusión (IDEA). Se muestran las realizaciones vertical (VIDEA) y horizontal (HIDEA), junto con una representación de cómo las posiciones 1, 2 y 3 muestran resultados positivo, negativo y positivo, respectivamente.

Definiciones

Como se usan en la presente memoria, las expresiones "virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS)" o "PRRSV" se refieren a un virus que causa el PRRS, la enfermedad misteriosa del cerdo (MSD), el síndrome respiratorio y de infertilidad porcino (SIRS), que antes se conocía como "síndrome de la oreja azul", síndrome respiratorio y de aborto epidémico porcino (PEARS), síndrome de Wabash, enfermedad porcina misteriosa (MPD), peste porcina, enfermedad de aborto azul o enfermedad de la oreja azul en el Reino Unido, *abortus blau* en los Países Bajos, *seuchenhafter spatabort der schweine* en Alemania y la enfermedad Heko-Heko.

La proteína del PRRSV se refiere a cualquier producto polipeptídico codificado por el genoma del PRRSV y/o producido sólo como resultado de la infección por PRRSV o del ciclo de vida del PRRSV. Así pues, los polipéptidos específicos del PRRSV y, por lo tanto, no codificados ni expresados por una célula infectada por el PRRSV pertenecen al alcance de la expresión. No se incluyen los polipéptidos endógenos codificados por una célula infectada por el PRRSV, pero no expresados en ausencia de infección por PRRSV y/o del ciclo de vida del PRRSV. Sin embargo, los polipéptidos endógenos expresados sólo como consecuencia de la infección por PRRSV y/o del ciclo de vida del PRRSV están dentro del alcance de la expresión. La expresión también incluye formas alternativas de los polipéptidos debidas a los cambios en la estructura secundaria y/o terciaria, tales como los que resultan de la desnaturalización parcial o sustancial de las proteínas como ejemplo no restrictivo. Así pues, las formas desnaturalizadas de los polipéptidos pertenecen al alcance de la expresión.

Antígeno del PRRSV se refiere a cualquier porción o fragmento de un polipéptido del PRRSV que es reconocido por un anticuerpo contra el PRRSV. En algunos casos, la parte o el fragmento puede ser un péptido con un resto unido tal como, pero sin limitación, un resto de azúcar, un resto fosfato o un resto lipídico. Como alternativa, la parte o el

fragmento puede ser un péptido sin ningún resto no peptídico unido.

Descripción detallada de los modos de poner en práctica la invención

En la presente memoria, se describen kits, dispositivos y métodos dirigidos a la detección de anticuerpos contra el PRRSV. La detección se basa en el uso de una o más proteínas y/o antígenos codificados por el PRRSV que se unen a anticuerpos contra dichas proteínas. Los anticuerpos son los presentes en un sujeto infectado con el PRRSV, pero ausentes en individuos no infectados. La invención se puede considerar como un ensayo de "captura de anticuerpos", donde se detecta el anticuerpo capturado. La invención también se puede considerar como aquella que proporciona métodos basados en inmunodifusión para la detección de anticuerpos contra el PRRSV.

La invención se basa en parte en el reconocimiento de que las proteínas estructurales del PRRSV, incluyendo la proteína de la nucleocápside (N), la proteína asociada a la membrana (M) y al menos 4 proteínas de la envoltura (E), se pueden usar para detectar anticuerpos en un sujeto infectado con el PRRSV. Dicho de otra manera, la invención se basa en parte en el descubrimiento de que los anticuerpos contra estas proteínas y/o sus porciones antigénicas están presentes en sujetos infectados con el PRRSV de modo que la detección de los anticuerpos proporciona un medio ventajoso para indicar que un sujeto está infectado con el PRRSV.

La invención también se basa en parte en el descubrimiento de que se pueden usar ciertas condiciones y protocolos para obtener una composición de proteínas y/o antígenos del PRRSV que contiene una alta concentración de proteínas E en relación con otras proteínas y/o antígenos del PRRSV. Así pues, la invención incluye un método de preparación de proteínas y/o antígenos del PRRSV a partir de células infectadas con el mismo. Las proteínas y/o antígenos se extraen poco después de la infección cuando la mayoría, o la totalidad, de las proteínas permanecen asociadas a las células infectadas o, de lo contrario, forman parte de un componente viral asociado con las células (CAVC) de la invención. Dicho de otra manera, la mayoría o la totalidad de las proteínas y/o los antígenos del PRRSV está bien dentro de las células infectadas o asociada a la membrana celular de las células infectadas. En dichas condiciones, relativamente pocas, si es que alguna de las partículas del PRRSV está presentes en el entorno extracelular. La invención se basa en parte en el descubrimiento inesperado de que las células infectadas durante un período relativamente corto de tiempo pueden producir cantidades suficientes de proteínas codificadas por el PRRSV que son adecuadas para su uso en los métodos de detección de la invención. La preparación del CAVC poco antes de la producción de las partículas del PRRSV y/o la liberación de las mismas en el entorno extracelular también tiene la ventaja de aportar una mayor seguridad, en tanto en cuanto no hay partículas virales infecciosas presentes como contaminantes.

La célula infectada puede ser cualquiera que sea capaz de ser infectada productivamente por el PRRSV. Los ejemplos no restrictivos incluyen las células porcinas, bien *in vitro* o *in vivo*. Un ejemplo no restrictivo de las células *in vitro* es el de células primarias de un sujeto porcino que están infectados con el PRRSV. Un ejemplo no restrictivo de células *in vivo* son macrófagos alveolares porcinos (PAM) que son infectados con el PRRSV por vía oronasal y luego extraídos posteriormente para la preparación de proteínas y/o antígenos del PRRSV. Otro ejemplo no restrictivo es con el uso de la línea celular de simio MARC-145. Las proteínas y/o los antígenos del PRRSV producidos por el método incluyen al menos una de entre las proteínas N, M, y E del PRRSV. Las combinaciones de estas proteínas también se pueden preparar a partir de células descritas en la presente memoria. Las proteínas/los antígenos preparados pueden tener una alta proporción de proteínas E en relación con las proteínas N y M.

Por lo tanto, la invención proporciona un método para la preparación de una composición vacunal que contiene proteínas y antígenos del virus del PRRS a partir de células infectadas por el virus del PRRS, donde el método comprende: a) proporcionar una población de células infectadas con el virus del PRRS; b) separar las células infectadas del virus del PRRS libre de células para formar las células que contengan proteínas y antígenos del virus del PRRS asociados a células; y c) extraer o eluir las proteínas y los antígenos de virus del PRRS de las células aisladas en la parte b). En los casos donde no haya virus libre de células presente, entonces, se puede modificar la parte b) para que simplemente sea un aislamiento de las células de otros materiales que puedan interferir con el método, tal como el medio de cultivo usado con las células. La parte b) se puede realizar mediante cualquier medio conocido en la técnica tal como mediante el uso de centrifugación para generar sedimentos y sobrenadante celulares que se retiran o se desechan, o mediante el uso de una membrana de filtración para eliminar el sobrenadante y retener las células. La parte c) se lleva a cabo opcionalmente volviendo a suspender las células en un tampón. La extracción o la elución se realiza con una solución que contenga detergente, por lo tanto el tampón usado para resuspender las células puede contener detergente.

En otras realizaciones, el método comprende el uso de una población de células que ha sido infectada con el virus del PRRS durante un tiempo suficiente para producir cantidades escasas o indetectables de unidades infecciosas por ml de sobrenadante, tales como los medios de cultivo usados con las células. Los ejemplos no restrictivos incluyen una dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID₅₀/ml inferior a 10¹⁵. La población de células usada en el método se puede haber infectado opcionalmente con el virus del PRRS durante un tiempo suficiente para observar CPE. Por supuesto, también se pueden usar en la práctica de la invención las células que no se han infectado durante un tiempo suficiente para observarse CPE, o las primeras etapas de CPE.

Un método de preparación de proteínas y antígenos del virus del PRRS a partir de células de macrófagos alveolares porcinos (PAM) infectadas por el virus del PRRS puede comprender la preparación de dichas proteínas y antígenos a partir de una población de células PAM obtenida por lavado pulmonar de un cerdo en el que se ha inoculado por vía oronasal el virus del PRRS. Las proteínas y los antígenos de virus del PRRS se pueden extraer o eluir de las células como se ha descrito anteriormente. Por lo tanto, las células se pueden volver a suspender en un tampón de extracción. La extracción o la elución se realizan con una solución que contiene detergente, por lo tanto el tampón usado para volver a suspender las células puede contener detergente.

La solución que contiene detergente puede ser cualquiera que sea adecuada para la extracción o elución de proteínas y/o antígenos del PRRSV. Un ejemplo no restrictivo es el uso de un detergente no iónico, como el *p*-isooctil-feniléter de poli(etilenglicol), octilfenoxipolietoxietanol (Nonidet P-40) o Triton X-100. En algunas realizaciones de la invención, el detergente está a una concentración del aproximadamente 0,5% en disolución, tal como una solución de Triton X-100 al aproximadamente 0,5%.

Un método de preparación de proteínas y antígenos de virus del PRRS a partir de células infectadas por el virus del PRRS comprende la preparación de dichas proteínas y antígenos a partir de una población de las células preparadas mediante métodos *in vitro* e *in vivo*. Para el método *in vitro*, se cultivan células de macrófagos alveolares porcinos (PAM) o células de la línea MARC-145, y se extraen las células tras la infección con el PRRSV. Para el método *in vivo* sin el uso de un sistema de cultivo celular, las células PAM se obtienen mediante el lavado pulmonar de un cerdo tras la inoculación del virus del PRRS por vía oronasal. Se compararon los rendimientos antigénicos usando diferentes aislados del PRRSV y diferentes días después de la inoculación del virus, y se determinaron las condiciones óptimas para los rendimientos antigénicos más altos mediante pruebas comparativas.

Las composiciones que contienen las proteínas y/o los antígenos del PRRSV aislados se pueden preparar mediante cualquiera de los métodos divulgados en la presente memoria. Las composiciones se pueden usar para cualquier propósito para el que se usen las proteínas y/o los antígenos del PRRSV. Los ejemplos no restrictivos incluyen el uso para preparar anticuerpos contra las proteínas/los antígenos; el uso como marcadores de referencia para las proteínas del PRRSV; y el uso como composiciones inmunogénicas, tales como en el caso de una formulación vacunal, opcionalmente con un adyuvante adecuado, que se administra a un animal para generar una respuesta inmune. Otros ejemplos no restrictivos adicionales de las composiciones incluyen aquellos en los que la/s proteína/s/ el/los antígeno/s está/n en forma soluble o liofilizada (criodesecada).

La composición puede estar en una solución adecuada para revestir una superficie, tal como una superficie de un dispositivo descrito en la presente memoria. Dichas soluciones permiten revestir con proteínas la parte inferior de placas de Petri. Los ejemplos no restrictivos incluyen soluciones de proteínas/antígenos del PRRSV diluidos en solución tampón de carbonato 0,06 M a pH 9,6. Las soluciones se pueden usar para revestir la superficie de una placa o pocillo, tal como las placas de Petri o las placas de múltiples pocillos de poliestireno o de vidrio, respectivamente. El material no adsorbido se puede decantar, tras lo que opcionalmente se realizan uno o más lavados en solución tamponada sin las proteínas/los antígenos. El revestimiento se puede realizar a diversas temperaturas, incluyendo aquellas inferiores a 25 °C, durante diversos períodos de tiempo. El revestimiento puede ser a o aproximadamente a 4 °C durante aproximadamente 72 horas.

Un método de revestimiento de una superficie con proteína/s y/o antígeno/s virales puede comprender a) proporcionar una solución que contenga una o más proteínas y antígenos de virus del PRRS preparados como se ha descrito en la presente memoria; y b) poner en contacto dicha solución con una superficie durante un período de tiempo que permita que dichas proteínas y antígenos se adsorban en la superficie de dicha placa. Las proteína/s y/o el/los antígeno/s se pueden extraer o eluir de las células infectadas por el virus del PRRS mediante el uso de una solución que contenga detergente como se ha descrito en la presente memoria. La superficie que se va a revestir puede ser de poliestireno o vidrio, o de un material similar. La superficie se lava preferentemente con etanol que luego se seca.

Se aplica una solución de proteínas/antígenos del PRRSV en la superficie limpia y se deja adsorber durante de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 horas a toda la noche. Las proteínas/los antígenos se pueden diluir hasta una concentración óptima de entre aproximadamente el 0,01 al 0,001%, preferentemente en un tampón de revestimiento de bicarbonato de sodio-carbonato de sodio para promover la adhesión de las proteínas/los antígenos a la superficie. El tampón de revestimiento debería ser preferentemente de aproximadamente 0,01 M a 0,1 M (pH 9 a 10), conteniendo de aproximadamente 0,84 a 8,4 gramos por litro de NaHCO₃ y de 0,11 a 10,6 gramos por litro de Na₂CO₃. Tras el período de revestimiento, se decanta el exceso de solución o se elimina de otro modo. La superficie revestida se puede lavar con agua destilada o tampón sin las proteínas/los antígenos. Al revestimiento con la/s proteína/s y/o el/los antígeno/s del PRRSV le puede seguir opcionalmente el revestimiento con un agente de bloqueo tal como, pero sin limitación, albúmina de suero bovino (ASB) al 1% en solución salina tamponada con fosfato (PBS), pH 7,2. El revestimiento se puede llevar a cabo a diversas temperaturas, incluyendo aquellas de aproximadamente 37 °C, durante diversos períodos de tiempo. El revestimiento se puede realizar a o aproximadamente a 37 °C durante aproximadamente 1 hora. Tras la aplicación del agente de bloqueo, la solución se retira y a esto le sigue opcionalmente uno o más lavados con agua o lavados que comprenden solución tampón sin el agente.

Tras el revestimiento, se aplica una capa de barrera permeable a la superficie revestida. La barrera se puede aplicar como una solución que más tarde forma una barrera permeable tras secarse. Los ejemplos no restrictivos incluyen soluciones de agar y/o agarosa que, cuando se secan, forman una barrera permeable compuesta de un material de tipo gel. Así pues, se puede aplicar una capa de agar o agarosa fundida y dejar que solidifique. La profundidad de la capa de agar no es importante y puede variar de al menos aproximadamente 1,5 mm y preferentemente de aproximadamente 2 mm a aproximadamente 10 mm. La capa se aplica de solución del aproximadamente 0,75 al 1,5%, y preferentemente del aproximadamente 1%.

Como un ejemplo no restrictivo con placas de Petri de poliestireno que tienen un diámetro de 60 mm, se usan 4 ml de agarosa al 0,6% en PBS para los métodos basados en VIDEA según lo descrito en la presente memoria. Se usan seis (6) ml de la misma solución para los métodos basados en HIDEA. La solución se deja solidificar, tal como a 4 °C, durante la noche. Los dispositivos así revestidos se pueden almacenar, tal como a 4 °C en una cámara de humedad, durante un máximo de 4 meses.

Un dispositivo con la superficie revestida como se ha descrito en la presente memoria se puede usar como la totalidad o parte de un kit de diagnóstico para la detección de anticuerpos contra el PRRSV. Un método de detección de anticuerpos contra el virus del PRRS puede comprender a) recoger una muestra de sangre o de suero sanguíneo de un sujeto; b) poner en contacto dicha muestra con una barrera permeable de un dispositivo revestido como se ha descrito en la presente memoria; c) incubar dicha muestra para permitir la difusión de las moléculas, tales como anticuerpos, a través de la barrera permeable y la unión a la/s proteína/s/antígeno/s usado/s para revestir el dispositivo; d) retirar la barrera permeable y, opcionalmente, lavar el dispositivo para eliminar los anticuerpos no unidos; e) detectar complejos formados por la unión de los anticuerpos con la/s proteína/s/antígeno/s. Con respecto al dispositivo de la parte b), un ejemplo no restrictivo es aquel donde el dispositivo es una placa de ensayo que comprende (1) una placa que tiene una superficie de soporte plana; (2) una cubierta adsorbida sobre dicha superficie de proteína/s/antígeno/s del PRRSV; y (3) una capa de agar que recubre dicha cubierta.

En cuanto a la parte e), el método puede ponerse en práctica con la aplicación de un agente detector que se une a los complejos formados. Un ejemplo no restrictivo es con el uso de un anticuerpo secundario que se une a los anticuerpos que puedan estar presentes en la muestra. Los ejemplos no restrictivos de dichos anticuerpos secundarios incluyen los de determinados animales, por ejemplo, ratón, rata, cabra, conejo, etc., que reconocen las porciones Fc de los anticuerpos en la muestra analizada.

El anticuerpo secundario se puede conjugar a un marcador para facilitar su detección. La conjugación modifica el anticuerpo mediante la unión de otro resto al mismo. El resto es preferentemente un marcador detectable, incluyendo un marcador directamente detectable tal como un isótopo radiactivo, un marcador fluorescente (Cy3 y Cy5 como ejemplos no restrictivos) o un marcador particulado. Los ejemplos no restrictivos de marcadores particulados incluyen partículas de látex, soles de metales y partículas coloidales de oro. Como alternativa, el marcador puede ser para la detección indirecta. Los ejemplos no restrictivos incluyen una enzima tal como, pero sin limitación, peroxidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina y peroxidasa de rábano picante. Otros ejemplos no restrictivos incluyen una molécula unida por otra molécula tal como, pero sin limitación, biotina, un péptido de afinidad o un marcador de purificación. Preferentemente, el marcador se une covalentemente.

El anticuerpo secundario puede ser una inmunoglobulina antiporcina conjugada a una enzima que se deja unir a los anticuerpos de los complejos durante aproximadamente 30 a aproximadamente 60 minutos. Tras la unión, se puede retirar el anticuerpo secundario no unido con uno o más lavados opcionales. La enzima puede ser cualquier enzima adecuada tal como las enzimas usadas en los ensayos de inmunoabsorción ligada a una enzima (ELISA), incluyendo una peroxidasa. La peroxidasa produce un color púrpura cuando reacciona con ácido aminosalicílico y peróxido de hidrógeno, o *p*-fenilendiamina y peróxido de hidrógeno. La fosfatasa alcalina produce un color amarillo cuando reacciona con dinitrofenilfosfato. La beta-galactosidasa reacciona con *O*-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido, dando un color púrpura.

Siguiendo con el ejemplo no restrictivo de un anticuerpo secundario ligado a una enzima, la detección de un complejo mediante la detección del anticuerpo secundario unido se puede realizar mediante el recubrimiento con una solución de agar que contiene un sustrato que se hace reaccionar mediante la enzima para producir una señal detectable, tal como una coloración como ejemplo no restrictivo. La señal detectable se puede observar visualmente tal como por el ojo humano sin necesidad de ningún instrumento. Se puede comparar la señal con la coloración observada con el uso de los controles positivos (que contienen anticuerpos contra el PRRSV conocidos que se unen a la superficie revestida) y/o controles negativos que no contienen dichos anticuerpos contra el PRRSV.

En algunas realizaciones de la invención, particularmente en el VIDEA descrito en la presente memoria, la muestra se recoge y se aplica a (o se recoge mediante) un material poroso tal como, pero sin limitación, papel filtrante o un disco de papel filtrante. Con el uso de discos de papel como ejemplo no restrictivo, el disco se coloca plano sobre la barrera permeable para permitir que las moléculas se difundan desde el disco, a través de la barrera, y hacia la superficie revestida. En la superficie, las moléculas (de tipo anticuerpo) de la muestra que se unen a las proteínas/antígenos del PRRSV de la invención forman complejos con las proteínas/antígenos. Por lo tanto, las

moléculas de la muestra quedan inmovilizadas en la superficie revestida. En algunas realizaciones, el período de tiempo para la difusión y la formación del complejo es de aproximadamente 2 a aproximadamente 3 horas bien a temperatura ambiente (25 °C) o a aproximadamente 37 °C

Tras la formación del complejo, se retira la barrera permeable. En algunas realizaciones que comprenden una barrera de agar o de agarosa, la capa de agar o agarosa se puede despegar tras lo que se pueden realizar lavados opcionales.

Los métodos de la invención se basan en la formación de un complejo que comprende las proteínas/los antígenos del PRRSV unidos a anticuerpos contra el PRRSV de una muestra como se ha descrito en la presente memoria. Los anticuerpos contra el PRRSV se pueden detectar para facilitar la detección del complejo. La detección de un complejo de proteínas/antígenos del PRRSV y anticuerpos contra el PRRSV de una muestra indica la presencia de infección por PRRSV en el sujeto del que se ha obtenido la muestra.

La invención proporciona además un método de ensayo enzimático de inmunodifusión vertical (VIDEA), comprendiendo dicho método a) proporcionar un dispositivo de diagnóstico que comprende al menos una superficie revestida con una o más proteínas y antígenos del PRRSV como se ha descrito en la presente memoria, habiendo sido dicha superficie recubierta con una capa de agar o de agarosa como se ha escrito en la presente memoria; b) poner en contacto la superficie de agar o agarosa con un material poroso que comprende una muestra que contiene anticuerpos obtenida de un sujeto; c) incubar dicho dispositivo durante un período suficiente para permitir la difusión del material de dicha muestra a dicha una o más superficies, teniendo lugar dicho período opcionalmente tras retirar el material poroso; y d) detectar la presencia de anticuerpos en la superficie de la placa tras retirar la barrera permeable. En algunas realizaciones, el material poroso es un disco de papel.

La invención proporciona además un método de ensayo enzimático de inmunodifusión horizontal (HIDEA), comprendiendo dicho método a) proporcionar un dispositivo de diagnóstico que comprende al menos una superficie revestida con una o más proteínas y antígenos del PRRSV como se ha descrito en la presente memoria, habiendo sido dicha superficie recubierta con una capa de agar o de agarosa como se ha escrito en la presente memoria, pero que comprende una o más hendiduras para recibir una muestra sobre dicha superficie; b) poner en contacto la una o más hendiduras con una muestra que contiene anticuerpos obtenida de un sujeto; c) incubar dicho dispositivo durante un período suficiente para permitir la difusión del material desde dicha muestra a dicha una o más superficies; y d) detectar la presencia de anticuerpos en la superficie de la placa tras retirar el agar o la agarosa. En algunas realizaciones, se perforan de uno a una pluralidad de orificios de pequeño diámetro en la barrera permeable para formar hendiduras que funcionan como pocillos de muestras de análisis. Los pocillos pueden ser de aproximadamente 1 a 4 mm de diámetro, por ejemplo, y penetrar a través de la cubierta de agar. El uso de una plantilla con siete pocillos circulares de 3 mm para perforar los orificios en el agar de cada placa de ensayo para el HIDEA es un ejemplo no restrictivo.

En ambas realizaciones de VIDEA e HIDEA, la muestra es una muestra de suero o una muestra de sangre entera. Los métodos se pueden aplicar a muestras de una variedad de animales y/o sujetos que pueden haber sido infectados con el PRRSV o que sean sospechosos de estar infectados con el virus del PRRS. El dispositivo de diagnóstico puede ser un plato, una placa o un pocillo de una placa. Se pueden usar controles tanto positivo como negativo con cada serie de muestras de ensayo. Se coloca la misma cantidad de suero de control en otros pocillos del dispositivo de ensayo.

Tras la incubación de las placas, se despegla la capa de gel de agar y se lavan las placas, tal como con un tampón de lavado tal como Tween 20 en solución salina tamponada con fosfato como ejemplo no restrictivo. Las placas se pueden lavar con agua destilada o agua corriente en lugar de tampón de lavado. El lavado elimina los anticuerpos no unidos (inespecíficos), así como otros contaminantes.

Ambos formatos VIDEA e HIDEA incluyen el uso de una reacción antígeno-anticuerpo para formar un complejo, que se puede detectar mediante el uso de un agente de detección tal como un anticuerpo secundario, para unirse al complejo, tal como mediante la unión de la porción de anticuerpo del complejo. El agente detector se puede mantener en contacto con los complejos durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. Luego se lavan las placas, tal como con solución de lavado tamponada como ejemplo no restrictivo para eliminar el conjugado no unido. El líquido de lavado se puede añadir lentamente desde el borde de la placa de ensayo con una jeringa o una pipeta y decantarlo. Esto se repite opcionalmente hasta tres veces o más.

Mientras se está incubando el agente detector, se prepara una cubierta de agar o agarosa. Como ejemplo no restrictivo, se funde una solución al 1% de agar, preferentemente en solución salina tamponada con fosfato, y se incorpora un sustrato para la enzima del conjugado. En algunas realizaciones, se incorpora un catalizador según sea necesario. Como ejemplo no restrictivo, cuando la enzima es una peroxidasa, la solución de agar al 1% puede contener del aproximadamente 0,05 al 0,10% de ácido 5-aminosalicílico como el sustrato y del aproximadamente 0,002 al 0,01% de peróxido de hidrógeno como catalizador. También se puede usar aproximadamente un 0,08% de sustrato y aproximadamente un 0,005% de catalizador. Se vierte el agar sobre la superficie lavada y se deja solidificar.

Se produce una coloración entre la enzima del anticuerpo secundario dentro de la capa de soporte de agar. La reacción ayuda a la visualización mediante una reacción de enzima-sustrato. Se midieron los diámetros de las zonas circulares de color púrpura oscuro para el HIDEA, y se registraron la presencia o la ausencia o la densidad de color para el VIDEA con el fin de determinar las cantidades de anticuerpo.

En el caso del HIDEA, el color se desarrolla en forma de una zona circular o un anillo. Los anillos son lo suficientemente oscuros para medir en aproximadamente 5 a aproximadamente 30 minutos la reacción del sustrato. Al permanecer durante períodos más largos, el anillo se oscurecerá, pero no se agrandará. El diámetro del anillo producido se relaciona con la cantidad de anticuerpo específico presente en la sangre (es decir, el título de neutralización del virus). Se mide el diámetro de la zona circular de color oscuro y se usa para correlacionarlo con un valor estándar de neutralización de anticuerpos de ensayo contra el virus. Los valores determinados se relacionan con el tamaño del pocillo de muestra de la placa de ensayo y el tamaño de la muestra usada. Se puede incluir una tabla de valores y/o representaciones de los anillos representativos con cada dispositivo o con cada kit.

Con la detección de la presencia de anticuerpos en la superficie tanto en el formato VIDEA como en el formato HIDEA, se pretende detectar anticuerpos unidos a proteína/s/antígeno/s del PRRSV en la superficie. La detección se puede realizar mediante cualquier medio descrito en la presente memoria, incluyendo el uso de un anticuerpo secundario marcado. Otros medios no restrictivos incluyen la visualización de una reacción antígeno-anticuerpo a través de una reacción de enzima-sustrato, mientras que la presencia de la reacción de coloración o densidad de la reacción se usa para indicar la cantidad (cuantitativa o semicuantitativa) o la presencia (cualitativa) de anticuerpos contra el PRRSV.

Las proteínas/los antígenos del PRRSV, así como las composiciones, los métodos y los dispositivos que comprenden las proteínas/los antígenos son adecuados para la preparación de kits producidos de acuerdo con procedimientos bien conocidos. Los kits que comprenden las proteínas/los antígenos del PRRSV según lo descrito en la presente memoria, o las composiciones o dispositivos que los comprenden, se pueden usar en uno o más métodos según lo divulgado en la presente memoria. Dichos kits comprenden además opcionalmente una descripción identificativa o etiqueta o instrucciones relativas a su uso en los métodos de la presente invención. Dicho kit puede comprender recipientes, cada uno con uno o más de los diversos reactivos (típicamente en forma concentrada) o dispositivos utilizados en los métodos. También se suele incluir una serie de instrucciones.

Los kits que comprenden un dispositivo descrito en la presente invención pueden comprender además uno o más reactivos o piezas de equipo adicionales para su uso con el dispositivo en un método de la invención. Los ejemplos no restrictivos de materiales adicionales para su inclusión son solución diluyente de la muestra, vial de diluyente y un gotero para la transferencia de la muestra. Otros ejemplos no restrictivos incluyen materiales porosos para su uso con el formato de VIDEA y anticuerpos secundarios.

Una vez descrita la invención de manera general, la misma se entenderá más fácilmente con referencia a los siguientes ejemplos que se proporcionan a modo ilustrativo, y no pretenden ser restrictivos de la presente invención, a menos que se especifique lo contrario.

Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de las proteínas del PRRSV y las placas

Las proteínas del PRRSV se pueden preparar mediante el uso de una cepa del PRRSV para inocular células susceptibles *in vitro* o *in vivo* y la recogida de las células infectadas en un momento óptimo para preparar los componentes virales asociados a las células. Para los métodos *in vitro*, el antígeno se puede preparar mediante un sistema de cultivo celular o mediante el uso de tecnologías recombinantes. Como alternativa, se pueden obtener células de macrófagos alveolares porcinos (PAM) infectadas con PRRSV de cerdos tras la inoculación oronasal del PRRSV y el lavado del pulmón (lavado pulmonar).

Se sedimentaron las células por centrifugación, y se eliminó o desechó el sobrenadante. Opcionalmente, los sedimentos se pueden lavar. Se suspendieron los sedimentos celulares en un tampón de tris(hidroximetil)aminometano 0,05 M y EDTA 0,025 M que contenía Triton X-100 al 0,5% en un volumen 5-10 veces mayor que el de las células envasadas. Se agitó la mezcla durante 2-15 horas a 4 °C y se centrifugó a 10.000 g durante 1 hora. El sobrenadante se usó como antígeno del PRRSV. El antígeno es no infeccioso, lo que permite un amplio uso sin riesgo de propagación viral.

Se predeterminó una dilución de proteína/antígeno del PRRSV en solución de tampón de carbonato 0,06 M a pH de aproximadamente 9,6 mediante ensayos comparativos. Se revistieron placas de Petri de poliestireno (60 mm de diámetro) con el antígeno mediante adsorción a 4 °C durante 72 horas. Se decantó el antígeno no adsorbido y se incubaron las placas con un agente de bloqueo (por ejemplo, albúmina de suero bovino al 1%, ASB) en solución salina tamponada con fosfato (PBS, pH 7,2) durante 1 hora a 37 °C. Tras eliminar la ASB, se cubrieron las placas de Petri con 6 ml para el HIDEA y 4 ml para el VIDEA de agarosa al 0,6% en PBS. Se dejó solidificar el agar a 4 °C durante la noche. Con una plantilla, se perforaron siete pocillos circulares de 3 mm sobre el agar de cada placa de

ensayo para el HIDEA. Para el VIDEA, se usaron las placas sin pocillos. Todas las placas de ensayo se almacenaron a 4 °C en una cámara de humedad durante un máximo de 4 meses.

Ejemplo 2: VIDEA

Las placas de ensayo se prepararon revistiendo el fondo de placas de Petri con antígenos virales, tras lo que se cubrieron con gel de agar en general según lo descrito anteriormente. En la práctica, se empapa un disco de papel filtrante con suero de ensayo porcino y se coloca sobre el agar de la placa de ensayo. Lo plano del disco presenta una zona inicial casi bidimensional de modo que el contenido de una muestra como un suero de ensayo se movería en general en una dirección a través del agar y hacia la superficie revestida.

Tras un período de incubación, se despegó el gel y se lavaron las placas 3 veces con 5 a 8 ml de solución de lavado (PBS que contenía Tween-20 al 0,05%). A continuación, se aplicaron 3 ml de IgG anti porcina de conejo conjugada con peroxidasa disponible en el mercado (1 a 2 µg/ml) diluida en PBS durante 45 minutos a 25 °C. Tras lavar de nuevo 3 veces las placas con solución de lavado, estas se recubrieron con 5 ml de agar al 1% en sustrato que contenía PBS (ácido 5-aminosalicílico) y H₂O₂ a concentraciones del 0,08% y 0,005%, respectivamente. Se registraron la presencia o ausencia o densidad de color para el VIDEA.

En un experimento, la incubación fue a 25 o 37 °C durante aproximadamente 2 a 3 horas, tras lo que se despegó el agar. Los resultados de la reacción de la peroxidasa se determinaron después de aproximadamente 5 a 10 minutos en base a las muestras positivas que mostraron una reacción de coloración. Se analizaron varias muestras de suero con proporciones muestra a positivo del ELISA o antecedentes conocidos de infección por el virus PRRS, junto con muestras de animales preinmunes. Se evaluaron la sensibilidad y la especificidad del VIDEA con respecto al ELISA. La siguiente Tabla 1 resume los resultados de este VIDEA y las correspondientes proporciones muestra a positivo del ELISA para diversos sueros porcinos. El porcentaje de concordancia entre los resultados de los ensayos se muestra entre paréntesis. El VIDEA mostró una especificidad del 100% por los sueros porcinos encontrados negativos en el ELISA. La incubación a 25 °C durante aproximadamente 3 horas mostró una concordancia del 100% para todas las muestras, en comparación con el ELISA.

Tabla 1

		VIDEA	VIDEA	VIDEA	VIDEA
		37 °C, 2 h	37 °C, 2 h	25 °C, 3 h	25 °C, 3 h
DO del ELISA	Nº de sueros de preinmune	positivo	negativo	positivo	negativo
< 0,4	40	0	40 (100%)	0	40 (100%)
0,4-0,9	30	20 (66,6%)	10 (33,3%)	30 (100%)	0
1,0-1,9	32	31 (96,9%)	1 (3,1%)	32 (100%)	0
> 2,0	17	17 (100%)	0	17 (100%)	0
	10	10 (100%)	0	10 (100%)	0

Las reacciones antígeno-anticuerpo se produjeron en tan solo 2 horas; sin embargo, tiempos más prolongados parecen beneficiosos en los casos de títulos de anticuerpos bajos, que se pueden observar como falsos negativos en los tiempos de incubación cortos. La alta correlación del VIDEA con las proporciones muestra a positivo del ELISA indica la capacidad del VIDEA como ensayo para la detección de anticuerpos contra el virus del PRRS. La correlación con la proporción muestra a positivo del ELISA de < 0,4, que es el corte estándar, sugiere que el VIDEA puede tener una sensibilidad equivalente al ELISA.

Ejemplo 2: HIDEA

Se usan dispositivos de la invención con una superficie revestida y una barrera permeable, donde el material de barrera se modifica de modo que define una o más hendiduras en la superficie de la barrera. Con el uso de agarosa como ejemplo no restrictivo, se pueden hacer uno o más pocillos en la agarosa.

Se llenó cada pocillo con 0,015 ml de suero de ensayo. Los dispositivos se incubaron durante aproximadamente 12 a aproximadamente 24 horas a temperatura ambiente (25 °C) para permitir la difusión de los anticuerpos y la reacción entre antígeno-anticuerpo. Se realizaron otros usos adicionales de los dispositivos con tiempos de incubación 24 horas.

Tras un período de incubación, se despegó el gel y se lavaron las placas 3 veces con 5 a 8 ml de solución de lavado (PBS que contenía Tween-20 al 0,05%). A continuación, se aplicaron 3 ml de IgG anti porcina de conejo conjugada con peroxidasa disponible en el mercado (1 a 2 µg/ml) diluida en PBS durante 45 minutos a 25 °C. Tras lavar de

nuevo 3 veces las placas con solución de lavado, se recubrieron las placas con 5 ml de agar al 1% en sustrato que contenía PBS (ácido 5-aminosalicílico) y H₂O₂ a concentraciones del 0,08% y 0,005%, respectivamente. Se midieron los diámetros de las zonas circulares de color púrpura oscuro en mm después de 5 a 30 minutos de reacción para el HIDEA. Las Tablas 2 y 3 muestran diferentes diámetros de 14 sueros analizados en diferentes condiciones. Los diámetros de < 7 mm se consideran negativos en el HIDEA. Algunos de los sueros negativos en el ELISA mostraron resultados positivos, lo que indica una mejor sensibilidad para el HIDEA. Los resultados de la Tabla 3 indican una alta reproducibilidad del HIDEA.

Tabla 2. Diámetros del HIDEA de sueros porcinos con diferentes proporciones muestra a positivo del ELISA usando varias horas de incubación a temperatura ambiente (25 °C)

Sero analizado		Horas de incubación			
		1518 h	h20	h24h	
1.	Libre de PRRS	3*6	4	5	
2.	Libre de PRRS	4	6	4	5
	Proporción muestra a positivo del ELISA**				
3.	0,06	7	8	9	9
4.	Proporción muestra a positivo del ELISA 0,21	8	10	10	10
5.	Proporción muestra a positivo del ELISA 0,73	8	11	11	11
6.	Proporción muestra a positivo del ELISA 1,96	11	13	14	14
7.	Proporción muestra a positivo del ELISA 2,83	12	14	15	15

* Diámetro (mm) en el HIDEA; superiores a 7 mm son positivos
 ** Proporciones muestra a positivo del ELISA superiores a 0,4 son positivos

Tabla 3. Reproducibilidad de los diámetros del HIDEA para 7 sueros con diferentes proporciones muestra a positivo del ELISA y diversas horas de incubación a temperatura ambiente (25 °C)

Sero analizado		3 h	6 h	12 h	15 h	21 h	24 h
1.	a. libre de PRRS	3*	3	3	3	4	4
	b. libre de PRRS	3	3	3	3	4	4
2.	a. libre de PRRS	3	3	3	3	4	4
	b. libre de PRRS	3	3	3	3	4	4
3.	a. negativo en ELISA	3	3	3	3	4	4
	b. negativo en ELISA	3	3	3	3	4	4
4.	a. negativo en ELISA	3	3	4	4	4	4
	b. negativo en ELISA	3	3	4	4	4	4
5.	a. Proporción muestra a positivo del ELISA de 0,54	5	7	7	8	9	9
	b. Proporción muestra a positivo del ELISA de 0,54	5	7	8	8	9	9
6.	a. Proporción muestra a positivo del ELISA de 1,80	5	7	7	7	10	10
	b. Proporción muestra a positivo del ELISA de 1,80	5	7	7	8	10	10
7.	a. Proporción muestra a positivo del ELISA de 2,59	5	7	7	8	10	11
	b. Proporción muestra a positivo del ELISA de 2,59	5	7	8	8	11	12
a y b. la reproducibilidad de cada muestra de suero se analiza dos veces mediante HIDEA							
* Diámetro (mm) en el HIDEA; <u>superiores a 7 mm</u> son positivos							
** Las proporciones muestra a positivo del ELISA superiores a 0,4 son positivas							

Como se usan en la presente memoria, los términos “un”, “uno”, “una”, “cualquier” y “cualquiera” pretenden incluir tanto las formas en singular como las formas en plural.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de una composición vacunal que contiene proteínas y antígenos del virus del PRRS a partir de células infectadas por el virus PRRS, comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar una población de células infectada con el virus del PRRS;
- (b) separar dichas células infectadas del virus del PRRS libre de células para formar células aisladas que contengan proteínas y antígenos del virus del PRRS asociadas con las células; y
- (c) extraer o eluir proteínas y antígenos del virus del PRRS de las células aisladas con una solución que contenga detergente para producir una preparación que comprenda proteínas y antígenos del virus del PRRS; y
- (d) combinar dicho extracto o eluido con un adyuvante para formar una composición vacunal.

2. El método de la reivindicación 1, donde dicha población de células ha sido infectada con el virus del PRRS durante un tiempo suficiente para producir una dosis infecciosa de cultivo de tejidos (TCID)₅₀/ml inferior a 10^{15} del sobrenadante.

3. El método de la reivindicación 1, donde dicha población de células ha sido infectada con el virus del PRRS durante un tiempo suficiente para observarse CPE en una etapa temprana.

4. El método de la reivindicación 1 o 2, donde dicha solución que contiene detergente contiene Triton X-100 al 0,5%.

5. El método de la reivindicación 1, 2, 3 o 4, donde dicha extracción o elución se realiza durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 15 horas a 4 °C.

6. El método de la reivindicación 1, 2, 3, 4 o 5, donde dichas proteínas y antígenos incluyen proteínas de la envoltura o la proteína N del virus del PRRS.

7. Un método basado en el ensayo enzimático de inmunodifusión vertical (VIDEA), comprendiendo dicho método:

- (a) proporcionar un dispositivo de diagnóstico que comprende al menos una superficie revestida con una o más proteínas y antígenos del virus del PRSS preparados mediante:
 - (i) el suministro de una población de células infectadas con el virus del PRRS;
 - (ii) la separación de dichas células infectadas del virus del PRRS libre de células para formar células aisladas que contengan proteínas y antígenos del virus del PRRS asociados con las células; y
 - (iii) la extracción o elución de las proteínas y los antígenos del virus del PRRS de las células aisladas con una solución que contenga detergente

- habiendo sido dicha superficie recubierta con una capa de agar o agarosa sobre dicha al menos una superficie;
- (b) poner en contacto la superficie de agar o agarosa con un material poroso que comprenda una muestra que contenga anticuerpos obtenida de un sujeto;
- (c) incubar dicho dispositivo durante un período suficiente para permitir la difusión del material de dicha muestra a dicha uno o más superficies, teniendo lugar dicho período opcionalmente después de retirar el material poroso; y
- (d) detectar la presencia de anticuerpos en la superficie de la placa tras retirar el agar o la agarosa.

8. El método de la reivindicación 7, donde dicha muestra es una muestra de suero o una muestra de sangre entera.

9. El método de la reivindicación 7 o 8, donde dicho material poroso es un disco de papel.

10. El método de la reivindicación 7 o 8, donde dicho sujeto es sospechoso de estar infectado con el virus del PRRS.

11. Un método basado en el ensayo enzimático de inmunodifusión horizontal (HIDEA), comprendiendo dicho método:

- a) proporcionar un dispositivo de diagnóstico que comprende al menos una superficie revestida con una o más proteínas y antígenos del virus del PRSS preparados mediante

- (i) el suministro de una población de células infectadas con el virus del PRRS;
- (ii) la separación de dichas células infectadas del virus del PRRS libre de células para formar células aisladas que contengan proteínas y antígenos del virus del PRRS asociados con las células; y
- (iii) la extracción o elución de las proteínas y los antígenos del virus del PRRS de las células aisladas con una solución que contenga detergente;
- habiendo sido dicha superficie recubierta con una capa de agar o agarosa que comprende una o más hendiduras para recibir la muestra sobre dicha al menos una superficie;

(b) poner en contacto la una o más hendiduras con una muestra que contenga anticuerpos obtenida de un sujeto;

(c) incubar dicho dispositivo durante un período suficiente para permitir la difusión del material de dicha muestra a dicha uno o más superficies; y

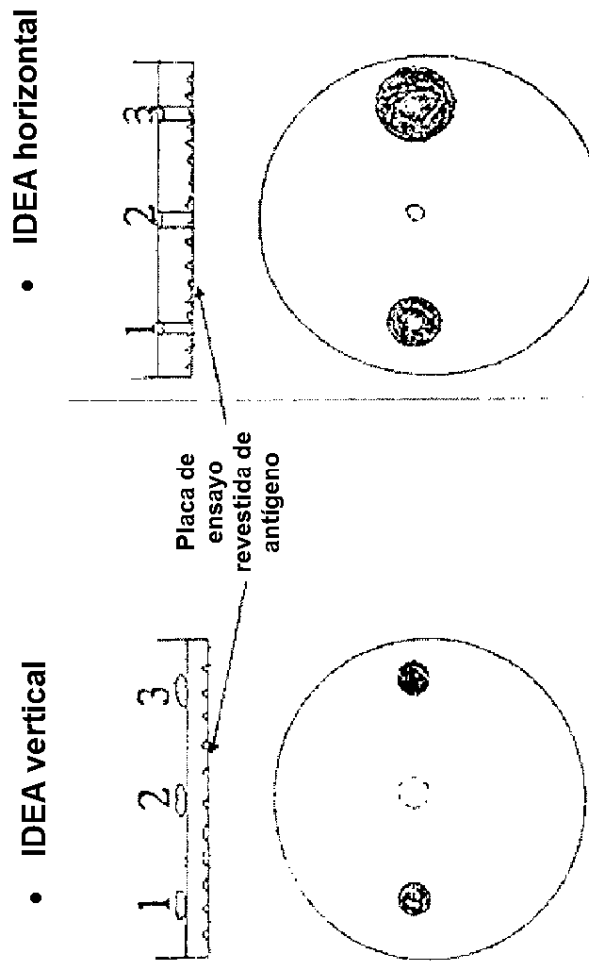
5 (d) detectar la presencia de anticuerpos en la superficie de la placa tras retirar el agar o la agarosa.

12. El método de la reivindicación 7 o 11, donde dicho dispositivo es una placa.

10 13. El método de la reivindicación 1, donde dicha solución que contiene detergente contiene detergente no iónico.

Figura 1

Ensayo enzimático de inmunodifusión (IDEA)



Las muestras 1, 2 y 3 muestran resultados positivo, negativo y positivo, respectivamente