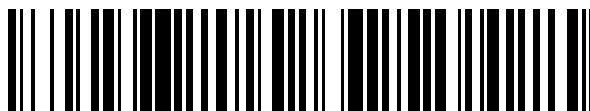


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 764**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.08.2012 PCT/IB2012/054092**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.02.2013 WO13027149**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.08.2012 E 12768901 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017 EP 2748612**

54 Título: **Diagnósticos de vacunación mejorados**

30 Prioridad:

24.08.2011 US 201161526792 P

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

26.12.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ANKENBAUER, ROBERT, G.;
NELSON, LYNN, D.;
OJEN, NANCEE L. y
WELCH, SIAO-KUN, W.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 647 764 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

Diagnósticos de vacunación mejorados

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a procedimientos y kits de diagnóstico mejorados para llevar a cabo el procedimiento para diferenciar entre (a) animales administrados con un pestivirus quimérico y (b) animales infectados con un virus de la diarrea viral bovina (VDVB) de tipo silvestre o inmunizados con una vacuna del VDVB convencional.

Antecedentes de la invención

10 Los pestivirus, incluidos el virus de la diarrea viral bovina (virus DVB o VDVB), se han aislado de varias especies de animales, tanto domésticos como salvajes. Entre los huéspedes identificados para el VDVB se incluyen el búfalo, el antílope, el reno y varias especies de ciervos, mientras que se han identificado especies de pestivirus únicos en jirafas y el antílope americano. EL VDVB es un pequeño virus ARN de la familia Flaviviridae. Está estrechamente relacionado con otros pestivirus que son los agentes causantes de la enfermedad de la frontera en ovejas y la peste porcina clásica en cerdos.

15 La enfermedad causada por el VDVB particularmente en el ganado es un fenómeno extendido y puede ser económicamente devastador. La infección de VDVB en ganado puede resultar en problemas de cría y puede causar abortos o nacimientos prematuros. El VDVB es capaz de cruzar la placenta de un ganado preñado y puede dar como resultado el nacimiento de terneros infectados de forma persistente (IP) que son inmunotolerantes al virus y virémicos de forma persistente por el resto de sus vidas. El ganado infectado también puede mostrar "enfermedad de las mucosas", caracterizado por una temperatura elevada, diarrea, tos y ulceraciones de la mucosa digestiva. Estos animales infectados de forma persistente proporcionan una fuente de diseminación del virus dentro de un rebaño y de brotes de enfermedad de las mucosas, y están altamente predispuestos a la infección por microorganismos responsables de causar enfermedades entéricas o neumonía.

20 Entre las vacunas del VDVB actualmente disponibles están aquellas que contienen virus de tipo silvestre inactivado químicamente, o aquellas que contienen VDVB vivo modificado (VM). El VDVB puede atenuarse mediante el pase repetido en células bovinas o porcinas, o mediante mutaciones inducidas químicamente que confieren un fenotipo sensible a la temperatura sobre el virus. Sin embargo, las vacunas VM inactivadas existentes no permiten la diferenciación entre animales vacunados e infectados de forma natural.

25 Una vacuna "marcada" que o bien podría contener un determinante antigénico adicional que no está presente en el virus de tipo silvestre, o bien que carece de un determinante antigénico que está presente en el virus de tipo silvestre podría ser una herramienta eficaz para controlar la infección por VDVB en el campo. La publicación de patente de EE.UU. n.º 2010/136055 (Luo y col.) describe la última, una vacuna basada en una vacuna de pestivirus quimérica en la que la proteína E^{ms} del VDVB se reemplaza con proteína E^{ms} a partir de un pestivirus de antilocapra americana. Este pestivirus quimérico se depositó como UC 25548 con ATCC®, y se le concedió la designación de depósito ATCC® de PTA-9939. Acompañado por un ensayo diagnóstico apropiado, el uso de este pestivirus quimérico permitiría la diferenciación entre animales a los que se les ha administrado, frente a animales infectados con VDVB de tipo silvestre o inmunizados con una vacuna de VDVB convencional.

Sumario de la invención

30 Según la presente invención se proporciona un procedimiento para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína E^{ms} del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en un ensayo ELISA competitivo, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:

- 35 a) incubar una muestra de suero de ganado en la presencia de proteína E^{ms} del pestivirus de antilocapra americana a la cual los anticuerpos que reaccionan en cruzado con la proteína E^{ms} de tipo silvestre son capaces de unirse, en la que dicha muestra se incubaba o bien antes de o bien simultáneamente con la etapa b);
- 40 b) añadir dicha muestra incubada a una placa de ensayo revestida con la proteína E^{ms} del VDVB a la cual dicho anticuerpo a detectar se une específicamente; y
- 45 c) detectar posteriormente en dicha muestra la presencia o ausencia de dicho anticuerpo.

50 Este procedimiento determina si un animal ha estado expuesto a un VDVB o inmunizado con una vacuna de VDVB convencional, en el que el animal infectado con VDVB o inmunizado con una vacuna de VDVB convencional posee un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo E^{ms} está presente en el VDVB, pero que no está presente en un pestivirus quimérico que ya no expresa una proteína E^{ms} a partir de un VDVB, sino que expresa una proteína E^{ms} a partir de un virus de antilocapra americana en un VDVB.

55 Se usa un kit de diagnóstico para llevar a cabo el procedimiento de la invención para determinar si un animal ha sido expuesto a un VDVB o inmunizado con una vacuna de VDVB convencional, comprendiendo dicho kit reactivos capaces de detectar anticuerpos a al menos un epítipo E^{ms} que está presente en el VDVB, pero que no está

presente en un pestivirus quimérico que ya no expresa una proteína E^{ms} a partir de un VDVB, sino que expresa una proteína E^{ms} a partir de un virus de antilocapra americana en un VDVB.

5 Por consiguiente, se proporciona el uso de un kit en el ensayo ELISA competitivo de la presente invención, en el que dicho kit comprende una placa de ensayo con la proteína E^{ms} del VDVB y reactivos que facilitan la detección de la presencia o ausencia de un anticuerpo al que al menos un epítipo E^{ms} del VDVB no está presente en una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana, en el que uno de dichos reactivos es una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana del mismo al cual los anticuerpos que reaccionan en cruzado con el E^{ms} del VDVB se unen.

10 En el presente documento también se describe el uso de un anticuerpo que se une a un epítipo presente en el VDVB o una vacuna del VDVB convencional, pero cuyo epítipo no está presente en un pestivirus quimérico que ya no expresa una proteína E^{ms} a partir de un VDVB, sino que expresa una proteína E^{ms} a partir de un virus de antilocapra americana en un VDVB.

El procedimiento de la presente invención también puede usarse para determinar si un animal posee un anticuerpo que se une específicamente a una proteína E^{ms} de VDVB.

15 En el procedimiento de la presente invención, la etapa de incubar dicha muestra de suero de ganado con proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana o un fragmento del mismo se produce antes de la etapa de detección en dicha muestra de la presencia o ausencia de dicho anticuerpo.

20 En otra realización, el procedimiento de la presente invención proporciona para la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína E^{ms} de VDVB, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a al menos un epítipo presente en una proteína E^{ms} de VDVB pero no presente en una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana.

En otra realización, el procedimiento de la presente invención proporciona para la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína E^{ms} de VDVB, en la que la presencia de dicho anticuerpo indica que el animal o bien ha sido infectado por VDVB o bien inmunizado con una vacuna de VDVB convencional.

25 En otra realización, el procedimiento de la presente invención proporciona para la determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína E^{ms} de VDVB, en la que la ausencia de dicho anticuerpo indica que: a) el animal no ha sido 1) infectado por VDVB o 2) inmunizado con una vacuna de VDVB convencional; o b) ha sido inmunizado con un pestivirus quimérico que expresa una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana.

30 Los procedimientos descritos en el presente documento también pueden usarse para determinar en una muestra la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína E^{ms} de VDVB, en la que se obtiene una muestra de suero a partir de un animal que es susceptible a infecciones de VDVB, tal como una especie bovina, ovina, caprina o porcina, preferentemente bovina.

35 En otra realización, se proporciona el uso de un kit para llevar a cabo el ensayo ELISA competitivo del procedimiento de la presente invención, en el que dicho kit comprende una placa de ensayo con la proteína E^{ms} del VDVB y reactivos que facilitan la detección de la presencia o ausencia de un anticuerpo al que al menos un epítipo E^{ms} del VDVB no está presente en una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana, en el que uno de dichos reactivos es una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana del mismo al cual los anticuerpos que reaccionan en cruzado con el E^{ms} del VDVB se unen.

40 En otra realización, el uso del kit proporcionado para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo mediante el procedimiento de la presente invención comprende como uno de los reactivos del kit, un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo presente en el VDVB o una vacuna de VDVB convencional, pero cuyo epítipo no está presente en una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana.

45 En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para determinar si un animal posee un anticuerpo que se une específicamente a una proteína E^{ms} de VDVB, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a un epítipo presente en una proteína E^{ms} de VDVB, pero cuyo epítipo no está presente en una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana.

Descripción detallada de la invención

50 Las siguientes definiciones pueden aplicarse a los términos empleados en la descripción de las realizaciones de la invención.

A menos que se defina lo contrario en el presente documento, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención deben tener los significados que se entienden comúnmente por aquellos expertos en la técnica. Además, a menos que se requiere lo contrario por contexto, los términos en singular incluyen pluralidades y los términos en plural incluyen el singular.

"Sobre" o "aproximadamente", cuando se usan en conexión con una variable numérica medible, se refiere al valor indicado de la variable y a todos los valores de la variable que se encuentra dentro del error experimental del valor indicado (por ejemplo, dentro del 95 % de intervalo de confianza para el promedio) o dentro del 10 por ciento del valor indicado, el que sea mayor.

- 5 El término "animal", tal como se usa en el presente documento, significa que incluye cualquier animal que es susceptible a infecciones por VDVB, incluyendo pero sin limitarse a especies bovinas, ovinas, caprinas o porcinas, tanto domésticos como salvajes.

10 El término "anticuerpo" o "anticuerpos", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse a un antígeno por medios de reconocimiento de un epítipo. Las inmunoglobulinas son proteínas de suero compuestas de cadenas de polipéptidos "ligeras" y "pesadas" que tienen regiones "constantes" y "variables" y que se dividen en clases (por ejemplos, IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM) basándose en la composición de las regiones constantes. Un anticuerpo que es "específico" para un antígeno dado indica que las regiones variables del anticuerpo reconocen y se unen a un antígeno específico de forma exclusiva. Los anticuerpos pueden ser una mezcla policlonal o monoclonales. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas a partir de fuentes naturales o a partir de fuentes recombinantes, o pueden ser partes inmunoreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden existir en una variedad de formas entre las que se incluye, por ejemplo, como, Fv, Fab', F(ab')₂, así como en cadenas únicas. Un anticuerpo puede convertirse en una proteína de unión a antígeno, que incluye, pero sin limitación, fragmentos de anticuerpo.

20 El término "antígeno", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que contiene uno o más epítopos (lineales, conformacionales o ambos) que con la exposición a un sujeto inducirá una respuesta inmune que es específica para ese antígeno. El término "antígeno" puede referirse a bacterias atenuadas, inactivadas o vivas modificadas, virus, hongos, parásitos u otros microbios. El término "antígeno" tal como se usa en el presente documento también se refiere a una subunidad de antígeno, que está separada y diferenciada de un organismo completo con el cual está asociado el antígeno por naturaleza. El término "antígeno" puede referirse a anticuerpos, tales como anticuerpos antiidiotipo o fragmentos de los mismos, y a mimotopos de péptidos sintéticos que pueden imitar un antígeno o determinante antigénico (epítipo). El término "antígeno" también puede referirse a un oligonucleótido o polinucleótido que expresa un antígeno o determinante antigénico in vivo, tal como en aplicaciones de inmunización de ADN.

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

35 Los términos "VDVB", "aislados de VDVB" o "cepas de VDVB", tal como se usa en el presente documento, se refieren a virus de la diarrea viral bovina, que incluyen pero no quedan limitados al tipo I y tipo II, que consisten en el genoma viral, asociado a las proteínas y otros constituyentes químicos (tal como lípidos). Los expertos en la técnica conocen una cantidad de virus de la diarrea viral bovina del tipo I y tipo II y están disponibles a través de, por ejemplo, the American Type Culture Collection (ATCC®; Manassas, VA 20108 EE.UU.). El virus de la diarrea viral bovina tiene un genoma en la forma de ARN. El ARN puede transcribirse inversamente en ADN para su uso en la clonación. Por lo tanto, las referencias que se realizan en el presente documento a las secuencias de ácido nucleico y virus de la diarrea viral bovina abarcan tanto secuencias de ARN virales como secuencias de ADN derivadas a partir de las secuencias de ARN virales. El término "NADL" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una cepa de referencia de VDVB, depositada en el ATCC como VR-534.

El término "línea de células" o "célula hospedadora", tal como se usa en el presente documento, significa una célula procarionótica o eucarionótica en la que puede replicarse o mantenerse un virus.

45 "Respuesta inmune celular" o "respuesta inmune mediada por célula" es una mediada por linfocitos T u otro tipo de glóbulos blancos o ambos, e incluye la producción de citocinas, quimiocinas y moléculas similares producidas por linfocitos T activados, glóbulos blancos o ambos.

El término "quimérico" o "quimera", tal como se usa en el presente documento, significa un microorganismo, por ejemplo un virus, que contiene componentes genéticos o físicos derivados a partir de más de un progenitor.

50 El término "vacuna de VDVB convencional", tal como se usa en el presente documento, significa una vacuna basada en un VDVB de tipo silvestre. El virus puede atenuarse o inactivarse. El virus no está modificado genéticamente, sin embargo.

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

55 El término "DIVA", tal como se usa en el presente documento, significa la diferenciación de animales infectados de animales vacunados.

"Dosis" hace referencia a una composición de vacunas o inmunogénica proporcionada a un sujeto. Una "primera dosis" o "vacuna de sensibilización" se refiere a la dosis proporcionada el día 0. Una "segunda dosis" o una "tercera dosis" o una "dosis anual" se refiere a una cantidad de tal composición proporcionada posteriormente a la primera dosis, que puede o no ser la misma vacuna o composición inmunogénica que la primera dosis.

- 5 El término "epítipo", tal como se usa en el presente documento, significa el sitio específico del antígeno que se une a un receptor de linfocito T o anticuerpo específico, y que comprende típicamente de aproximadamente 3 restos de aminoácido a aproximadamente 20 restos de aminoácido y que puede ser continuo o discontinuo.

10 "Fragmento" se refiere a una parte truncada de una proteína o gen. "Fragmento funcional" y "fragmento biológicamente activo" se refiere a un fragmento que retiene las propiedades biológicas de la longitud completa de la proteína o el gen. Un "fragmento inmunogénicamente activo" se refiere a un fragmento que estimula una respuesta inmune.

El término "heterólogo", tal como se usa en el presente documento, significa derivado de una especie o cepa distinta.

El término "homólogo", tal como se usa en el presente documento, significa derivado de la misma especie o cepa.

"Respuesta inmune humoral" se refiere a una que está al menos en parte mediada por anticuerpos.

- 15 "Respuesta inmune" en un sujeto se refiere al desarrollo de una respuesta inmune humoral, una respuesta inmune celular o una respuesta inmune humoral y celular a un antígeno. La respuesta inmunogénica puede ser suficiente para fines diagnósticos u otras pruebas, o puede ser adecuada para prevenir señales y síntomas de enfermedad, incluidos efectos en la salud adversos o complicaciones de la misma, causados por la infección por un agente de enfermedad.

- 20 "Inmunogénico" o "inmunogenicidad", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de estimular una respuesta inmune dirigida específicamente contra un antígeno.

25 El término "composición inmunogénica", tal como se usa en el presente documento, significa una composición que es capaz de ser reconocida por el sistema inmune, lo que da como resultado la generación de una respuesta inmune específica (es decir, tiene actividad inmunogénica" cuando se administra sola o con un portador aceptable farmacéuticamente, a un animal.

El término "cantidad inmunológicamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de un antígeno eficaz para inducir una respuesta inmunogénica o inmunológica en un animal. La respuesta inmune puede comprender, sin limitación, la inducción de inmunidad celular y/o humoral.

30 "Aislado", tal como se usa en el presente documento, significa retirado de su entorno que se da de forma natural. Cuando se hace referencia a un microorganismo, puede estar bien solo o en una célula hospedadora heteróloga, o cromosoma o vector (por ejemplo, plásmidos, bacteriófagos, etc.). "Bacterias aisladas", "bacterias anaeróbicas aisladas", "cepa bacteriana aislada", "virus aislado", "cepa viral aislada" y similares hace referencia a una composición en la que las bacterias o virus están prácticamente libres de otros microorganismos, por ejemplo, en un cultivo, tal como cuando se separan del entorno que se dan de forma natural. "Aislado", cuando se usa para describir cualquier sustancia definida particularmente, tal como un polinucleótido o polipéptido, se refiere a la sustancia que está separada de su entorno celular original en el que se encuentra la sustancia -tal como un polipéptido o ácido nucleico-. Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, únicamente a modo de ejemplo, una línea celular recombinante construida con un polinucleótido de la invención hace uso del ácido nucleico "aislado". Como alternativa, si una proteína particular o un fragmento inmunogénico específico se reivindica o se usa como una vacuna u otra composición, se consideraría que está aislado porque se ha identificado, separado y en cierta medida purificado en comparación a cómo puede existir por naturaleza. Si la proteína o el fragmento inmunogénico específico de la misma se produce en una bacteria recombinante o un vector de expresión eucariota que produce el antígeno, se considera que existe como una proteína aislada o ácido nucleico. Por ejemplo, una línea celular recombinante construida con un polinucleótido hace uso de un ácido nucleico "aislado".

- 45 El término "multiplicidad de infección" (MOI), tal como se usa en el presente documento, se refiere a una relación de la cantidad de microorganismos por célula, que detalla cuánto inóculo va a usarse en una infección dada.

Los términos "patógeno" o "microorganismo patogénico", tal como se usa en el presente documento, significa un microorganismo -por ejemplo un virus, bacteria, hongo, protozoo o helminto- que es capaz de inducir o causar una enfermedad, dolencia o estado anormal en su animal hospedador.

- 50 El término "pestivirus", tal como se usa en el presente documento, significa un virus ARN del género Pestivirus, de la familia Flaviviridae. Los pestivirus incluyen, aunque no de forma limitativa, VDVB (tipo 1 y tipo 2), virus de la peste porcina clásica (VPPC) y virus de la enfermedad de la frontera (VEF), así como pestivirus aislados de especies tales como jabalí, búfalo, alce de África, bisonte, alpaca, pudu, bongo, diversas especies de ciervo, jirafa, reno, sarrío, y antílope americano (Vilcek y Nettleton; Vet Microbiol. 116:1-12 (2006)).

"Farmacéuticamente aceptable" se refiere a sustancias, que se encuentran dentro del ámbito de un juicio razonable médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de sujetos sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, acorde con una relación razonable de beneficio-riesgo y eficaz para su uso concedido.

5 Los términos "prevenir", "que previene" o "prevención" y similares, tal como se usa en el presente documento, significan que inhiben la replicación de un microorganismo, para inhibir la transmisión de un microorganismo o para inhibir que un microorganismo se establezca él mismo en su hospedador. Estos términos y similares tal como se usan en el presente documento, también significan que inhiben o bloquean una o más señales o síntomas de infección.

10 "Protección", "que protege" y similares, tal como se usa en el presente documento respecto a una vacuna u otra composición, significa que la vacuna o composición previene o reduce los síntomas de la enfermedad causada por el organismo del cual se deriva el/los antígeno(s) usado(s) en la vacuna o composición. Los términos "protección" y "que protege" y similares, también significa que la vacuna o composición puede usarse para tratar terapéuticamente la enfermedad o uno de más síntomas de la enfermedad que ya existe en un sujeto.

15 Los términos "unión específica", "que se une específicamente", y similares, tal como se usa en el presente documento, se definen como dos o más moléculas que forman un complejo que es medible en condiciones fisiológicas o de ensayo y es selectivo. Se dice que un anticuerpo u otro inhibidor "se une específicamente" a una proteína si, en condiciones apropiadamente seleccionadas, tal unión no se inhibe sustancialmente, mientras que al mismo tiempo se inhibe la unión no específica. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y es selectiva para el compuesto o proteína. La unión no específica normalmente tiene una baja afinidad. La unión en anticuerpos IgG, por ejemplo, se caracteriza generalmente por una afinidad de al menos aproximadamente 10^{-7} M o superior, tal como al menos aproximadamente 10^{-8} M o superior, o al menos aproximadamente 10^{-9} M o superior, o al menos aproximadamente 10^{-10} o superior, o al menos aproximadamente 10^{-11} M o superior, o al menos aproximadamente 10^{-12} M o superior. El término también es aplicable cuando, por ejemplo, un dominio de unión a antígeno es específico para un epítipo particular que no está portado por numerosos antígenos, en cuyo caso el anticuerpo que porta el dominio de unión a antígeno, no se unirá generalmente a otros antígenos.

25 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", tal como se usa en el presente documento, significa una cantidad de un microorganismo o una subunidad de antígeno, o polipéptidos, o moléculas policuleótidas y combinaciones de los mismos, o una vacuna o una composición, que se necesita para tratar una enfermedad en el sujeto al cual este se administra.

30 Los términos "tratar", "que trata" o "tratamiento" y similares, tal como se usa en el presente documento, significa la reducción o eliminación de una infección por un microorganismo. Estos términos y similares tal como se usan en el presente documento, significan la reducción de la replicación de un microorganismo, para reducir la transmisión de un microorganismo o para reducir la capacidad de un microorganismo en establecerse él mismo en su hospedador. Estos términos y similares tal como se usan en el presente documento, también pueden significar la reducción, mejora o eliminación de uno o más señales o síntomas de infección por un microorganismo o aceleración de la recuperación de una infección por un microorganismo.

35 Los términos "vacuna" y "vacunar" y similares, tal como se usa en el presente documento, significa la administración a un animal de una vacuna o composición inmunogénica.

40 Los términos "vacuna" o "composición de vacuna", tal como se usa en el presente documento, significa una composición que previene o reduce una infección, o que previene o reduce una o más señales o síntomas de infección. Los efectos protectores de una composición de vacuna frente a un patógeno se logran normalmente mediante la inducción en el sujeto a una respuesta inmune, bien una respuesta inmune mediada por célula o humoral o una combinación de ambos. Hablando de manera general, la supresión o reducción de incidencias de infección, mejora de las señales o síntomas, o eliminación acelerada del microorganismo de los sujetos infectados son indicativos de los efectos protectores de una composición de vacuna. Las composiciones de vacuna de la presente invención proporcionan efectos protectores frente a infecciones causadas por el VDVB.

45 El término "portador veterinariamente aceptable", tal como se usa en el presente documento, se refiere a sustancias, que se encuentran dentro del ámbito de un juicio razonable médico, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica y similares, acorde con una relación razonable de beneficio-riesgo y eficaz para su uso concedido.

50 La siguiente descripción se proporciona para ayudar aquellos expertos en la materia en la práctica de la presente invención.

Detección, Procedimientos de diagnóstico, Kits

55 La presente invención proporciona un procedimiento para determinar si un animal ha sido expuesto a pestivirus específicos, bien a través de infección o vacunación.

La vacunación que utiliza vacuna DIVA -una que permite la diferenciación entre animales infectados y animales

vacunados- proporciona un medio para evaluar la historia de exposición del animal sujeto. Esta diferenciación puede lograrse a través de cualquier de los diversos procedimientos de diagnóstico, que incluyen pero no quedan limitados al ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), que puede ser competitivo, directo o indirecto, ensayo de flujo lateral, transferencia de Western, PCR, radioinmunoensayo, inmunoensayo de fase sólida (SPRIA), ensayo electroquimoluminiscente (ECL), inmunotransferencia, inmunoprecipitación e inmunotinción. Estos y otros procedimientos son fácilmente reconocidos y conocidos para un experto en la técnica.

Los pestivirus quiméricos descritos en el presente documentos pueden distinguirse de las cepas del VDVB de tipo silvestre en tanto su composición genómico y proteínas expresadas. Tal distinción puede permitir la discriminación entre animales vacunados e infectados. Por ejemplo, puede realizarse una determinación en cuanto a si un animal que resulta positivo en VDVB en determinados ensayos de laboratorio porta una cepa de VDVB de tipo salvaje o ha sido inmunizado con una vacuna de VDVB convencional o si ha sido administrado con un pestivirus quimérico o no está infectado.

Pueden emplearse una variedad de ensayos para realizar la determinación. Por ejemplo, el virus puede aislarse del animal que resulta positivo para la infección. Los ensayos a base de ácido nucleico pueden incluir, aunque no de forma limitativa, análisis por transferencia Southern o Northern, PCR y secuenciación. Como alternativa, pueden emplearse ensayos a base de proteínas. En los ensayos a base de proteína, las células o tejidos sospechosos de una infección pueden aislarse del animal que resulta positivo para el VDVB. Los extractos celulares pueden realizarse de tales células o tejidos y pueden ser sometidos a, por ejemplo, Transferencia Western, usando anticuerpos adecuados frente a proteínas virales que pueden identifican de forma distintiva la presencia de bien el pestivirus quimérico administrado en una vacuna o el VDVB de tipo silvestre.

El alcance y la naturaleza de las respuestas inmunes inducidas en el animal pueden evaluarse usando una variedad de técnicas. Por ejemplo, Se pueden recoger sueros a partir de animales inoculados y analizar para la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para el virus quimérico.

En la realización de tal evaluación, es crítico que los anticuerpos generados por el animal sean específicos para el antígeno de prueba en el ensayo y no reaccionen en cruzado con el mismo antígeno de otros pestivirus. No se esperaba que los anticuerpos que reconocen y se unen a la proteína E^{ms} del pestivirus de antilocapra americana también se unieran a la proteína E^{ms} presente en el VDVB de tipo silvestre. Sin embargo, las administraciones repetidas del pestivirus quimérico a ganado llevó ocasionalmente a la generación de anticuerpos que exhibían reactividad en cruzado limitada a la proteína E^{ms} del VDVB de tipo silvestre. Estos anticuerpos reactivos en cruzado son capaces de unirse a la proteína E^{ms} del VDVB de tipo silvestre unida a la placa (es decir, el antígeno de prueba), lo que condujo a resultados que sugerían la infección previa con VDVB de tipo silvestre o vacunación con una vacuna de VDVB convencional, es decir, un resultado positivo falso. Por lo tanto, existe una necesidad de mejorar la exactitud y especificidad del ensayo. Esto puede lograrse mediante la incubación de los sueros a partir de animales en la presencia de la proteína E^{ms} de antilocapra americana. La proteína puede ser nativa - es decir, purificada a partir de pesivirus de antilocapra americana- o expresada de forma recombinante. La adición de la proteína E^{ms} de antilocapra americana puede realizarse antes de la adición de los sueros a la(s) placa(s) de ensayo, o al mismo tiempo que se añaden los sueros a la(s) placa(s) de ensayo. Esto es eficaz en la retirada de anticuerpos reactivos en cruzado E^{ms}, y da como resultado en ensayo más exacto y fiable.

Un kit para su uso en llevar a cabo el procedimiento de la presente invención puede comprender uno o más reactivos útiles para la detección de y diferenciación entre (1) un animal infectado por VDVB o uno inmunizado con una vacuna de VDVB convencional y (2) un animal administrado con un pestivirus quimérico. El kit puede incluir reactivos para analizar una muestra para la presencia del VDVB completo o polipéptidos del VDVB, epítomos o secuencias polinucleótidas que no están presentes en el pestivirus quimérico. Como alternativa, los kits de la presente invención pueden incluir reactivos para analizar una muestra para la presencia de un pestivirus quimérico o polipéptidos, epítomos o secuencias polinucleótidas que no están presentes en el VDVB de tipo silvestre. La presencia de virus, polipéptidos o secuencias polinucleótidas pueden determinarse usando anticuerpos, PCR, hibridación u otro procedimiento de detección conocido para aquellos expertos en la materia.

Otro kit para su uso en llevar a cabo el procedimiento de la presente invención puede proporcionar reactivos para la detección de anticuerpos frente a epítomos particulares. Los epítomos están o bien presentes en el pestivirus quimérico y no presentes en el VDVB de tipo silvestres o bien, de modo alternativo, presentes en el VDVB de tipo silvestres y no presentes en el pestivirus quimérico. Tales reactivos son útiles para el análisis de una muestra para la presencia de anticuerpos, y son fácilmente conocidos y disponibles para un experto habitual en la materia. La presencia de anticuerpos puede determinarse usando procedimientos de detección estándar conocidos por los expertos en la materia.

Los kits pueden incluir un conjunto de instrucciones impresas o una etiqueta que indique que el kit es útil para la detección y diferenciación de animales infectados por VDVB o vacunados de VDVB a partir de animales administrados con un pestivirus quimérico.

Anticuerpo, Anticuerpos

Los anticuerpos pueden ser bien monoclonales, policlonales o recombinantes. Los anticuerpos pueden prepararse frente el inmunogen o una parte del mismo. Por ejemplo, un péptido sintético basado en la secuencia de aminoácido del inmunogen, o preparado de forma recombinante mediante técnicas de clonación o el producto de gen natural y/o partes del mismo puede aislarse y usarse como el inmunogen. Los inmunogenes pueden usarse para producir anticuerpos mediante tecnología de producción de anticuerpos estándar bien conocida para aquellos expertos en la materia, tal como se describe generalmente en Harlow y Lane, "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, (1988). Los fragmentos de anticuerpo también pueden prepararse a partir de los anticuerpos, e incluyen Fab, F(ab')₂, y Fv, mediante procedimientos conocidos por los expertos en la materia.

En la producción de anticuerpos, puede lograrse la detección del anticuerpo deseado mediante procedimientos estándar en inmunología conocida en la técnica. En general, tanto el ELISA como transferencia de Western son tipos de inmunoensayos que pueden usarse, y ambos son bien conocidos por los expertos en la materia. Pueden usarse tanto los anticuerpos policlonales como monoclonales en los ensayos. El anticuerpo usado para unir la proteína E^{ms} de VDVB puede enlazarse a un sustrato de soporte sólido. El anticuerpo puede conjugarse con un resto o etiqueta detectable. Los restos detectables contemplados para su uso en la presente invención pueden incluir, aunque no de forma limitativa, marcadores fluorescentes, metálicos, enzimáticos y radioactivos entre los que se incluye, aunque no de forma limitativa biotina, oro, ferritina, fosfatasa alcalina, galactosidasa b, peroxidasa, ureasa, fluoresceína, rodamina, tritio, ¹⁴C, y yodación. El anticuerpo conjugado con un resto detectable puede unirse a la proteína E^{ms} de VDVB, como en el ensayo ELISA competitivo o puede unirse a anticuerpos de un animal que se une a la proteína E^{ms} de VDVB, como en un ensayo ELISA indirecto.

En técnicas de ensayo de unión específica de conjugado de etiqueta, se combina una muestra del medio líquido a analizar con diversas composiciones de reactivo. Tales composiciones incluyen un conjugado de etiqueta que comprende un componente de unión incorporado con una etiqueta. El componente de unión en el conjugado participa con otros constituyentes, en caso de haberlos, de la composición de reactivo y el ligando en el medio sometido a ensayo para formar un sistema de reacción de unión que produce dos especies o formas del conjugado, por ejemplo, una especie enlazada (complejo de conjugado) y una especie libre. En las especies enlazadas, el componente de unión del conjugado se une mediante un compañero de unión correspondiente, mientras que en las especies libres, el componente de unión no está enlazado. La cantidad de analito es proporcional a la cantidad del enlace frente al conjugado no enlazado.

Descripción general del desarrollo del ensayo

El ganado al que se le ha administrado un pestivirus quimérico, en el que la proteína E^{ms} del VDVB se reemplaza con la proteína E^{ms} de un pestivirus de antilocapra americana, puede distinguirse de ganado infectado de forma natural con un VDVB de tipo silvestre o inmunizado con un VDVB convencional a través del uso de la invención que se describe en el presente documento. Ganado de diversas edades o bien no se trata o se le administra tres dosis de bien un pestivirus quimérico vivo o inactivado, o un VDVB vivo o inactivado, con aproximadamente tres semanas entre cada dosis. Las muestras de suero se recogen 2-3 semanas o después de cada administración, pero antes de la siguiente administración. Para diferenciar entre ganado que recibió el pestivirus quimérico o aquellos que no reciben tratamiento, frente a aquellos infectados por una cepa de campo (tipo silvestre) de VDVB o inmunizados con una vacuna de VDVB convencional, las muestras de suero se analizan a través de un ensayo de diagnóstico diferencial.

Para un ELISA competitivo, puede usarse VDVB de tipo silvestre o proteína E^{ms} de pestivirus quimérico (derivado de forma natural, sintética o recombinante) como una fuente de antígeno en el ensayo. Si se usa la proteína E^{ms} presente en el VDVB de tipo silvestre como el antígeno de prueba, una carencia de unión por el mAb específico de E^{ms} del VDVB de tipo salvaje marcado indica la presencia de anticuerpos en el suero de ganado que se une el epítipo específico de VDVB de tipo silvestre, indicativo de una infección natural (tipo silvestre) o inmunización con una vacuna de VDVB convencional. Por el contrario, el suero de ganado al que se ha proporcionado pestivirus quimérico no contendrá anticuerpos que se unen a la proteína E^{ms} del VDVB de tipo salvaje que reviste la placa. Por lo tanto, el mAb específico de E^{ms} del VDVB de tipo salvaje marcado se unirá a la proteína enlazada y resulta en el desarrollo de color posterior.

En el ensayo anteriormente descrito, fue sorprendente que los anticuerpos que reconocen y se unen a la proteína E^{ms} del pestivirus de antilocapra americana también se unieran a la proteína E^{ms} presente en el VDVB de tipo silvestre. Debido a la administración repetida del pestivirus quimérico a ganado resultó ocasionalmente en la generación de anticuerpos que exhibían reactividad en cruzado limitada a la proteína E^{ms} del VDVB de tipo silvestre, lo que condujo a resultados que sugerían la infección previa con VDVB o vacunación con una vacuna de VDVB convencional, existía una necesidad de mejorar la exactitud y especificidad del ensayo.

Para un ELISA de competición mejorada, se incuban muestras de suero con proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana expresada de forma recombinante bien antes de o bien de forma concurrente con la adición de suero de ganado a las placas de ensayo. Esto retira de forma eficaz anticuerpos que pueden unirse a la proteína

E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana, pero también han desarrollado reactividad en cruzado con proteína E^{ms} del VDVB de tipo silvestre. Por lo tanto, el desarrollo de color en el ensayo indica que el animal o bien no ha sido tratado previamente a la exposición de VDVB o bien está vacunado con pestivirus quimérico, mientras que el no desarrollo de color indica que el animal se expuso a VDVB de tipo silvestre o vacunó con una vacuna de VDVB convencional.

La presente invención se ilustra además mediante, pero de ningún modo limitada a, los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

Se construyó un baculovirus recombinante que expresa E^{ms} BVDV-NADL. Una molécula de ADN que codificada una fusión genética de una parte de 3' del gen C del VDVB y la longitud completa del gen E^{ms} se amplificó mediante PCR a partir de un plásmido que contiene la longitud completa de ADNc de BVDV-NADL con cebadores Oligo 250 (SEQ ID NO: 1; 5'-CACCATGAAAATAGTGCCCAAAGAATC-3') y Oligo 252 (SEQ ID NO: 2; 5'-TTAAGCGTATGCTCCAAACCGTC-3'). El producto PCR se clonó en pENTR™/D-TOPO (Invitrogen; Carlsbad, CA) y se transformó en One Shot® Competent de *E. coli* (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El plásmido recombinante se extrajo y el inserto se confirmó mediante secuenciación. El plásmido se denominó pENTR-E^{ms}. La pENTR-E^{ms} y el Sistema de Expresión de Baculovirus BaculoDirect™ (Invitrogen) se usaron para construir baculovirus recombinante que expresaba la proteína E^{ms} de VDVB-NADL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó baculovirus recombinante que expresaba la proteína E^{ms} de VDVB-NADL, se purificó por placa, se expandió y almacenó a tanto 4 °C como a -80 °C. La expresión de la proteína E^{ms} de VDVB-NADL en el baculovirus recombinante se confirmó mediante tinción inmunofluorescente y transferencias de Western usando MAb 15C5 específico de E^{ms} de VDVB (Idexx Laboratories Inc.; Westbrook, ME).

La proteína E^{ms} del pestivirus de antilocapra americana se expresó en el baculovirus usando una estrategia similar. La expresión de la proteína E^{ms} de antilocapra americana se confirmó mediante tinción inmunofluorescente y transferencias de Western usando MAb (Invitrogen) anti-His (C-terminal).

Para la producción del antígeno ELISA, se infectaron células Sf21 o Sf9 en un cultivo de suspensión de 100 ml con materia de baculovirus recombinante en MOI de 0,2 a 5. Las células se recogieron después de 2 a 4 días de incubación a 27 °C. Las células se centrifugaron a baja velocidad (aproximadamente 800 g) durante 10 min para recoger las células. Las células se sometieron a lisis con tampón de lisis/unión nativo (pH 8,0 50 mM de NaH₂PO₄, 300 mM de NaCl, 10 mM de Imidazol y 1 % de IGEPAL CA-630). La mezcla se pipeteó arriba y abajo para romper los grupos celulares y a continuación se congeló a -80 °C durante ≥ 1 hora. Después de descongelarla, la mezcla se clarificó mediante centrifugación a 8000 g durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante final, denominado lisato E^{ms} de Baculo-Antilocapra americana, se alicuotó y almacenó a -80 °C.

En la realización del ensayo, las placas ELISA se revistieron durante la noche a 4 °C con 100 µl/pocillo de MAb WB210 (Veterinary Laboratory Agency, Surrey, Reino Unido), que se une específicamente a la proteína E^{ms} de VDVB de tipo 1, se diluyó a 1 µg/ml en tampón de carbonato/bicarbonato (pH 9,0). Al día siguiente, las placas se lavaron tres veces con tampón de lavado PBST (PBS que contiene 0,05 % de Tween 20) y se incubó con tampón de bloqueo (PBST más 1 % de sal de sodio de caseína) a 37 °C durante 1 hora. Las placas se lavaron posteriormente tres veces con PBST, y se añadieron 100 µl de lisato E^{ms} de Baculo-VDVB (diluido 1:1600 en PBS) a cada pocillo y las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Durante este periodo de incubación, se añadieron 60 µl de suero de ganado a 60 µl de diluyente de muestra que contenía tampón de bloqueo y una concentración pre-determinada de lisato E^{ms} de Baculo-Antilocapra americana. Las mezclas de suero-diluyente se incubaron a temperatura ambiente durante al menos 30 minutos. Después de los tres lavados con PBST, las mezclas suero-diluyente se transfirieron a los pocillos de las placas ELISA. Múltiples pocillos se dejaron en blanco en cada placa, para servir como controles de 15C5-HRP no competitivos. Las placas se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Después de tres lavados más con PBST, se añadieron 100 µl de conjugado de MAb 15C5-HRP (específico a E^{ms} de VDVB; diluido en tampón de bloqueo) a cada pocillo a 37 °C durante 1 hora. Después de tres lavados, se añadieron 100 µl de sustrato ABTS (KPL, Gaithersburg, MD) a cada pocillo y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 - 60 minutos para el desarrollo de color. La densidad óptica (DO) se midió a la longitud de onda de 405/490 nm. El porcentaje de inhibición de DO a partir del control de conjugado para cada muestra de suero se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = (\text{DO de muestra}) \div (\text{Promedio de DO de Controles de 15C5-HRP}) \times 100 \%$$

Se vacunaron seis ganados seronegativos de VDVB por grupo de tratamiento con VDVB activado (cepa NADL), el pestivirus quimérico o sin vacuna (NTX). Las vacunaciones se realizaron en intervalos de tres semanas. Las muestras de suero se recogieron en cada punto de tiempo, antes de administrar las vacunas. Las muestras a continuación se analizaron en el ensayo anteriormente descrito.

Resultados

Los datos que se presentan en la Tabla 1 representan una comparación de respuestas serológicas de ganado administrado con antígenos experimentales y controles sin tratar. Los datos presentados se generaron usando el ensayo de diagnóstico original y el ensayo de diagnóstico mejorado, el cual se encuentra en la presente invención.

ES 2 647 764 T3

Las muestras de suero se recogieron después de la administración al ganado de dos dosis de VDVB inactivado o dos dosis de pestivirus quimérico inactivado. Basándose en varias muestras positivas y negativas de VDVB conocidas, los valores de corte para positivo ("Pos"), negativo ("Neg") o dudoso ("+-") se definieron como sigue:

- 5
- <40% = Pos
 - 40% - 50% = +/-
 - > 50% = Neg

Tabla 1.

ID animal	Tratamiento	% de inhibición	
		Ensayo original (sin diluir)	Ensayo mejorado (1:1)
1358	NTX	Neg	Neg
1364	NTX	Neg	Neg
1365	NTX	Neg	Neg
1368	NTX	Neg	Neg
1372	NTX	Neg	Neg
1374	NTX	Neg	Neg
1351	VDVB (cepa NADL)	Pos	Neg
1352	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos
1354	VDVB (cepa NADL)	Pos	Neg
1361	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos
1363	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos
1370	VDVB (cepa NADL)	Pos	Neg
1355	Pestivirus quimérico	NA	Neg
1357	Pestivirus quimérico	Neg	Neg
1359	Pestivirus quimérico	Neg	Neg
1360	Pestivirus quimérico	Neg	Neg
1366	Pestivirus quimérico	Neg	Neg
1369	Pestivirus quimérico	Pos	Neg

10 Los datos que se presentan en la Tabla 2 representan una continuación del experimento descrito anteriormente para la Tabla 1. En este caso, las muestras de suero se recogieron tras la administración de una tercera dosis de o bien el VDVB inactivado o el pestivirus quimérico inactivado.

Tabla 2.

ID animal	Tratamiento	% de inhibición	
		Ensayo original (sin diluir)	Ensayo mejorado (1:1)
1358	NTX	Neg	Neg
1364	NTX	Neg	Neg
1365	NTX	Neg	Neg
1368	NTX	Neg	Neg
1372	NTX	Neg	Neg
1374	NTX	Neg	Neg
1351	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos

(continuación)

ID animal	Tratamiento	% de inhibición	
		Ensayo original (sin diluir)	Ensayo mejorado (1:1)
1352	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos
1354	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos
1361	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos
1363	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos
1370	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos
1355	Pestivirus quimérico	Pos	Neg
1357	Pestivirus quimérico	Pos	Neg
1359	Pestivirus quimérico	Pos	Neg
1360	Pestivirus quimérico	Neg	Neg
1366	Pestivirus quimérico	+/-	Neg
1369	Pestivirus quimérico	Pos	Neg

5 Los datos que se presentan en la Tabla 3, generados usando el ensayo DIVA E^{ms} original y el ensayo DIVA E^{ms} mejorado, representa una comparación de respuestas serológicas en ganado administrado con tres dosis de bien un VDVB atenuado vivo o un pestivirus quimérico vivo.

Tabla 3.

ID animal	Tratamiento	% de inhibición	
		Ensayo original (sin diluir)	Ensayo mejorado (1:1)
5688	NTX	Neg	Neg
5699	NTX	Neg	Neg
5700	NTX	Neg	Neg
5701	NTX	Neg	Neg
5706	NTX	Neg	Neg
5709	NTX	Neg	Neg
1351	VDVB (cepa NADL)	Pos	Neg
1352	VDVB (cepa NADL)	Pos	Neg
1354	VDVB (cepa NADL)	Pos	Neg
1361	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos
1363	VDVB (cepa NADL)	Pos	Pos
1370	VDVB (cepa NADL)	Pos	Neg
1355	Pestivirus quimérico	Neg	Neg
1357	Pestivirus quimérico	Neg	Neg
1359	Pestivirus quimérico	Pos	Neg
1360	Pestivirus quimérico	Neg	Neg
1366	Pestivirus quimérico	Neg	Neg
1369	Pestivirus quimérico	Neg	Neg

Los datos demuestran que la etapa adicional de incubar suero de ganado con proteína E^{rms} de pestivirus de antilocapra americana expresada de forma recombinante, antes de su adición a las placas de ensayo, es eficaz en la retirada de anticuerpos reactivos en cruzado capaces de unirse tanto al VDVB y proteína E^{rms} de antilocapra americana. Por lo tanto, el estado serológico de aquellos animales que recibieron el pestivirus quimérico mostraron un VDVB negativo en el ensayo DIVA mejorado, y no VDVB falsamente positivo (es decir, infectado con VDVB o vacunado con una vacuna de VDVB convencional).

Ejemplo 2

El ensayo DIVA descrito en el Ejemplo 1 se combina en tándem con otro ensayo de captura de antígeno específico de VDVB o ensayo de anticuerpo, para determinar si una muestra negativa detectada con el ensayo DIVA del Ejemplo 1 (es decir, uno que es a partir de un animal o bien vacunado con el pestivirus quimérico o bien un animal no infectado sin tratar previamente) está realmente sin tratar previamente o es, en cambio, a partir de un animal vacunado con el pestivirus quimérico.

La muestra negativa a partir del ensayo DIVA del Ejemplo 1 se analiza para la presencia de un segundo anticuerpo o antígeno a VDVB que estará presente incluso en un animal que ha sido vacunado con pestivirus quimérico. En este ensayo, se analiza adicionalmente una muestra a partir de un animal que se ha determinado "negativo" para VDVB con el ensayo DIVA del Ejemplo 1 para la presencia o ausencia de otro antígeno o anticuerpo específico de VDVB. Por ejemplo, el ensayo DIVA del Ejemplo 1 se combina con una prueba de captura de antígeno o una prueba de detección de anticuerpo para un anticuerpo que se une específicamente a otro antígeno de VDVB, por ejemplo, proteína E2 de VDVB. Como alternativa, la muestra a partir de un animal que se ha determinado "negativo" para VDVB con el ensayo DIVA del Ejemplo 1 se analiza para anticuerpos específicos para VDVB p80/125 (es decir, NS 2/3) de proteína no estructural. Los ensayos para la detección de tales proteínas están disponibles en el mercado y se describen, por ejemplo, SERELISA® BVDV p80 Ab Mono Blocking kit (Synbiotics Corporation; Kansas City, MO.)

Una lectura ilustrativa a partir de una combinación del ensayo DIVA del Ejemplo 1 con un ensayo para un anticuerpo que se une específicamente a otro antígeno de VDVB, tal como p80, producirá resultados tal como se ejemplifican en la Tabla 4.

Tabla 4:

Estado del animal	Lectura por ensayo indicado	
	DIVA	p80
Sin tratar previamente (no infectado; no vacunado)	-	-
Infectado con VDVB de tipo silvestre	+	+
Vacunado con vacuna de VDVB de tipo silvestre (vivo o muerto)	+	+
Vacunado con vacuna de pestivirus quimérico desvelada (vivo o muerto)	-	+

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Ankenbauer, Robert G
 Nelson, Lynn D
 Oien, Nancee L
 Welch, Siao-Kun W

<120> DIAGNÓSTICOS DE VACUNA MEJORADOS

<130> PC71766

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador Oligo 250

<400> 1
 caccatgaaa atagtgccca aagaatc 27

<210> 2
<211> 25
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

5

<220>
<223> cebador Oligo 252

<400> 2
ttaagcgtat gtcctcaaacc acgtc 25

10

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de determinación de la presencia o ausencia de un anticuerpo que se une específicamente a una proteína E^{ms} del virus de la diarrea viral bovina (VDVB) en un ensayo ELISA, competitivo, comprendiendo dicho procedimiento las etapas de:
- 5 a) incubar una muestra de suero de ganado en presencia de la proteína E^{ms} del pestivirus de antilocapra americana a la cual los anticuerpos que reaccionan en cruzado con la proteína E^{ms} del VDVB de tipo silvestre son capaces de unirse, en el que dicha muestra se incubaba o bien antes de o bien simultáneamente con la etapa b);
- 10 b) añadir dicha muestra incubada a una placa de ensayo recubierta con la proteína E^{ms} del VDVB a la cual dicho anticuerpo a detectar se une específicamente; y
- c) detectar posteriormente en dicha muestra la presencia o ausencia de dicho anticuerpo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo se une específicamente a al menos un epítipo presente en una proteína E^{ms} del VDVB, pero no está presente en una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la presencia de dicho anticuerpo indica que el animal o bien ha sido infectado por VDVB de tipo silvestre o bien ha sido inmunizado con una vacuna del VDVB convencional.
4. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que la ausencia de dicho anticuerpo indica que el animal no ha sido 1) infectado con el VDVB de tipo silvestre o 2) inmunizado con una vacuna del VDVB convencional o ha sido inmunizado con un pestivirus quimérico que expresa una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana.
- 20 5. Uso de un kit en el ensayo ELISA competitivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que dicho kit comprende una placa de ensayo recubierta con la proteína E^{ms} del VDVB y reactivos que facilitan la detección de la presencia o ausencia de un anticuerpo al que al menos un epítipo E^{ms} del VDVB no está presente en una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana, en el que uno de dichos reactivos es una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana a la cual los anticuerpos que reaccionan en cruzado con el E^{ms} del VDVB se unen.
- 25 6. El uso del kit de la reivindicación 5, en el que uno de dichos reactivos es un anticuerpo que se une específicamente a un epítipo presente en el VDVB de tipo silvestre o una vacuna del VDVB convencional, pero cuyo epítipo no está presente en una proteína E^{ms} de pestivirus de antilocapra americana.