

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 668 459**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/569** (2006.01)

**G01N 33/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.12.2014 PCT/EP2014/078373**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.06.2015 WO15091736**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.12.2014 E 14815702 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 3084441**

54 Título: **Prueba de diagnóstico mejorado para anticuerpos del VPPC**

30 Prioridad:

**19.12.2013 EP 13198615**

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

**18.05.2018**

73 Titular/es:

**INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)**

**Wim de Körverstraat 35**

**5831 AN Boxmeer, NL**

72 Inventor/es:

**BRUDERER, URS PETER**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 668 459 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**

Prueba de diagnóstico mejorado para anticuerpos del VPPC

5 La presente invención se refiere al campo del diagnóstico veterinario, específicamente a una prueba para la detección de anticuerpos contra VPPC. En particular, la invención se refiere a un método de detección de anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre en una muestra de ensayo. Además, la invención se refiere a un kit de prueba de diagnóstico, y al uso del método de detección de anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre. Además, la invención se refiere a un método para diferenciar animales infectados por VPPC de tipo silvestre de los animales  
10 que fueron vacunados contra VPPC con una vacuna contra VPPC, y a un método de control de una infección por VPPC de tipo silvestre en una población de animales de la especie porcina.

Diferentes pruebas son conocidas para el serodiagnóstico de la infección por un microorganismo, a fin de determinar si un ser humano o animal es positivo o negativo para el microorganismo o para los anticuerpos contra el microorganismo. Normalmente, tales pruebas comprenden técnicas para la detección de inmunocomplejos que pueden haberse formado, usando un anticuerpo definido para proporcionar especificidad. Con frecuencia, la prueba también tendrá una etapa que consiste en amplificar la intensidad de la señal, y una o más etapas que consisten en lavar los componentes no unidos, no específicos o no deseados. La detección de inmunocomplejos puede encontrarse de distintas maneras, tales como ópticamente mediante la detección de un cambio de color, una fluorescencia, o un cambio en el tamaño de partículas, o alternativamente, por la detección de antígenos radiactivamente marcados o anticuerpos en inmunocomplejos. Del mismo modo, la forma física de la prueba puede variar ampliamente y puede p. ej., emplear una placa de microtitulación, una membrana, una tira reactiva, un chip biosensor, una matriz de gel, o una solución que comprende (micro)partículas portadoras, tales como látex, metal, o poliestireno, etc.  
15

La elección de una configuración particular de dicha prueba está generalmente determinada por el tipo de muestra de entrada, la sensibilidad de prueba deseada (identificar correctamente una muestra positiva), y especificidad (discriminar correctamente las muestras positivas verdaderas de las negativas verdaderas); tales propiedades dependen de la resistencia y el momento de una respuesta inmunitaria, o de la presencia de un microorganismo. Además, los requisitos para la economía de la prueba, tales como su aplicabilidad a gran escala y sus costos pueden ser decisivos para la selección de un formato particular.  
20

Las pruebas de diagnóstico bien conocidas son: radioinmunoensayos, inmunodifusión, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación, aglutinación, hemólisis, neutralización y "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas" o ELISA. Especialmente, para pruebas a gran escala, la automatización del manejo de líquidos, la lectura del resultado y el procesamiento, o ambos, pueden ser un requisito. Esto también puede requerir el reemplazo de un formato de ensayo tradicional con un formato más moderno y miniaturizado, tal como en AlphaLISA™ (Perkin Elmer).  
25

Pruebas de diagnóstico muy utilizadas son inmunoensayos enzimáticos, tales como ELISA. Éstas son fácilmente escalables y pueden ser muy sensibles. Una ventaja adicional es el intervalo dinámico de sus resultados ya que las muestras pueden someterse a ensayo en un intervalo de dilución. Los resultados se expresan en unidades arbitrarias de absorbancia, normalmente entre 0,1 y 2,5 unidades de densidad óptica (OD), dependiendo de las propiedades y configuraciones del equipo técnico utilizadas para la lectura. Habitualmente, se incluyen muestras de control positivas y negativas apropiadas, y la mayoría de las veces, las muestras se ensayan múltiples veces. La normalización se obtiene mediante la inclusión de (un intervalo de dilución de) una muestra de referencia definida, que también permite coincidir una cierta puntuación con los valores preestablecidos para determinar positivos o negativos, y permite la correlación con un significado biológico, por ejemplo: una cantidad de antígeno respecto a la potencia, o una cantidad de anticuerpos con un nivel de protección inmunitaria.  
30

Son conocidas numerosas variantes de una configuración ELISA, pero normalmente se emplea la inmovilización de un antígeno o un anticuerpo en una fase sólida, p. ej., en un pocillo de una placa de microtitulación. Cuando se inmoviliza un anticuerpo, la prueba se denomina ELISA tipo "captura" o "sándwich". A continuación, se añade una muestra de ensayo, permitiendo que el ligando (p. ej., un antígeno o anticuerpo a detectar) se una. Acto seguido, se añade un detector (un anticuerpo, un antígeno u otro componente de unión) que está conjugado a un marcador, por ejemplo, a una enzima que puede inducir una reacción de color, que se puede leer espectrofotométricamente. Otros tipos de marcadores podrían usar luminiscencia, fluorescencia o radiactividad. El uso de un detector marcado tiene por objeto proporcionar amplificación de la intensidad de la señal para potenciar la sensibilidad de la prueba, sin embargo, también puede introducir la señal de fondo, reduciendo la relación señal a ruido.  
35

En una variante del protocolo de ELISA, la especificidad de la prueba se mejora mediante la introducción de una unión competitiva, en cuyo caso la prueba se denomina ELISA "competitivo", por "inhibición", tipo "interferencias", o de bloqueo. En dicho ensayo, un factor en la muestra de ensayo (un anticuerpo o un antígeno) compite con un anticuerpo/antígeno detector marcado por la unión a una molécula (antígeno o anticuerpo) inmovilizada en la fase sólida. Esto causa una reducción en la señal de color máxima, que es una forma sensible de medir la presencia o la cantidad del factor de competencia. El resultado se puede expresar como un porcentaje de inhibición de la señal máxima de ELISA.  
40  
45  
50  
55  
60  
65

Debido a su versatilidad y sensibilidad, ELISA se usa generalmente, por ejemplo, para epidemiología, programas de vigilancia de infecciones, o para verificar la eficacia de una campaña de vacunación. Este uso de ELISA también se extiende al sector de la salud animal, por ejemplo para controlar la erradicación y las medidas de control de las enfermedades infecciosas más relevantes. Crítico en ese contexto es un nivel suficiente de sensibilidad y especificidad de la prueba de diagnóstico, ya que los fallos en este sentido pueden tener graves consecuencias en ambos sentidos: los falsos positivos pueden causar una cuarentena innecesaria o el sacrificio de los animales, y los falsos negativos pueden causar la propagación de un patógeno por transporte de animales portadores no detectados a través de las fronteras. Un ejemplo de tal uso de ELISA reside en el control de una enfermedad de declaración obligatoria EDO, tal como peste porcina clásica (PPC) en los animales de la especie porcina.

La PPC, también conocida como cólera porcina o peste porcina, es una enfermedad a menudo fatal de animales de la especie porcina, que se produce en todo el mundo. Es causada por el virus de la peste porcina clásica (VPPC), también conocido como virus del cólera porcino, que es altamente infeccioso. La enfermedad causa mucho sufrimiento a los animales, y considerables pérdidas económicas a los sectores que dependen de la agricultura comercial de cerdos y sus productos.

El VPPC pertenece a la familia de *Flaviviridae*, y al género *Pestivirus*. Otros *Pestivirus* bien conocidos son virus de la enfermedad de la frontera (VEF), que infecta a ovejas y cerdos, y el virus de la diarrea viral bovina (VDVB), que infecta a vacas, ovejas y cerdos. Un cierto nivel de protección cruzada se produce entre estos virus relacionados. El virión de PPC es relativamente pequeño y está envuelto, y comprende el genoma viral de ARN monocatenario en sentido positivo de aproximadamente 12,3 kb. Este genoma se traduce en una gran poliproteína de aproximadamente 4.000 aminoácidos, que se autoescinde por una serie de proteínas virales no estructurales. Esto da lugar a las principales glicoproteínas de la envoltura viral estructurales: Erns, E1 y E2. Para una revisión sobre el virus y su enfermedad, véase: Moennig (2000, *Vet. Microbiol.*, vol. 73, pág. 93).

El criterio de referencia para la detección de anticuerpos contra VPPC es la prueba de neutralización del virus. Sin embargo, ya que es laboriosa y difícil, las pruebas tipo ELISA se usan para la identificación sistemática y detección rápidas, y varias pruebas comerciales está disponible para la detección del antígeno del VPPC o anticuerpos contra VPPC. Tales pruebas se revisan en Blome *et al.* (2006, *Rev. Sci. Tech. (Int. Off. Epiz.)*, vol. 25, pág. 1025). Las pruebas para el antígeno del VPPC detectan el virus entero o las proteínas (envoltura) virales específicas, tales como Erns o E2. Del mismo modo, las pruebas para anticuerpos contra VPPC detectan virus o anticuerpos contra E2 o Erns. La detección de anticuerpos en un animal diana es más sensible que la detección de un antígeno o virus, debido a que los anticuerpos están presentes en el animal durante más tiempo, proporcionando una ventana de tiempo más amplia para la detección. Además, debido a la reactividad cruzada entre *Pestivirus*, las pruebas de diagnóstico para VPPC basadas en la detección de antígeno o anticuerpos contra Erns no son fiables en regiones con una alta prevalencia de VEF y/o VDVB. Por lo tanto, el enfoque actual para el diagnóstico del VPPC se encuentra en la detección de anticuerpos contra la proteína E2 del VPPC. Para una revisión: Schroeder *et al.* (2012, *Rev. Sci. Tech. (Int. Off. Epiz.)*, vol. 31, pág. 997).

La proteína E2 del VPPC (previamente conocida como glicoproteína E1 o gp51-54) está codificada a partir del aminoácido (aa) en la posición 690 de la poliproteína del VPPC. La proteína E2 del VPPC maduro es de aproximadamente 370 aa de longitud, es decir, sin una secuencia de señales en el extremo N-terminal de aproximadamente 22 aa que se solapa con el extremo C-terminal de E1, pero incluye una región transmembranal en el extremo C-terminal de aproximadamente 40 aa (Ganges *et al.*, 2005, *vaccine* vol. 23, pág. 3741). En E2, el dominio A inmunodominante se ubica entre el aminoácido en las posiciones 766 y 866 de la poliproteína (van Rijn *et al.*, 1993, *J. of Gen. Virol.*, vol. 74, pág. 2053). Dentro de ese dominio, se ha identificado un epítipo de células B lineal que produce anticuerpos neutralizantes de virus: el epítipo TAVSPTTLR (SEQ ID NO: 1). Este epítipo se ubica en la poliproteína del VPPC en el aminoácido en las posiciones 829-837, correspondiente a los aa en 140-148 de la secuencia de aa de E2, y está bien conservado entre las cepas del VPPC, pero no reacciona de forma cruzada con anticuerpos contra VDVB o VEF (Lin *et al.*, 2000, *J. of Virol.*, vol. 74, pág. 11619).

Se han desarrollado un número de pruebas comerciales para anticuerpos contra E2 que emplean la especificidad de este epítipo: PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 (anteriormente denominado Ceditest® CSFV 2,0) (ambos de: Prionics AG, Schlieren-Zúrich, Suiza), e IDEXX CSFV Ab Test® (IDEXX Europe B.V., Hoofddorp, Países Bajos). Estas pruebas son pruebas de ELISA tipo competitivo que usan una proteína E2 del VPPC inmovilizado. Cuando cualquiera de los anticuerpos contra E2 está presente en la muestra de ensayo, éstos se unen a E2 del VPPC inmovilizado, y así compiten con un anticuerpo indicador marcado, que es un anticuerpo monoclonal conjugado a una enzima específico para el epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC de tipo silvestre; los anticuerpos monoclonales marcados usados como indicador en estos kits se denominan V2 (Prionics) o A18 (IDEXX), y tienen la misma especificidad que el anticuerpo monoclonal WH303 usado por Lin *et al.* (2000, *supra*).

Las vacunas contra PPC son conocidas y se usan habitualmente en los países en los que VPPC es endémico. Puesto que las vacunas inactivadas contra VPPC eran poco prácticas, ya que se han utilizado durante muchos años vacunas de virus vivos atenuados; las más eficaces se basan en la llamada cepa China o C. Tienen un historial muy fiable de muchos años de uso, y es también la única vacuna viva atenuada permitida en la Unión Europea, aunque solo se usa para las vacunaciones de emergencia en caso de brotes de PPC. A menudo, un programa de control

gubernamental para PPC (p. ej., Directiva del Consejo Europeo 2001/89/EC) está respaldado por un sistema de restricciones comerciales que prohíben el transporte de cerdos que son seropositivos para anticuerpos contra VPPC.

5 Sin embargo, algunos países pueden sufrir reinfecciones frecuentes desde el reservorio natural del VPPC en cerdos salvajes y jabalíes. En consecuencia, se producen brotes ocasionales de PPC, y muchos cerdos - tanto infectados como no infectados - son sacrificados. Esto provoca preocupaciones éticas, así como costos considerables. Además, los cerdos sometidos a una vacunación de emergencia ya no pueden ser exportados, ya que se han vuelto seropositivos. Esto se traduce en un hacinamiento en los establos y otras pérdidas económicas.

10 Por lo tanto, los esfuerzos se centraron en el desarrollo de vacunas que permitan la "diferenciación de los animales infectados de los vacunados" serológica o DAIV. El principio básico detrás de este tipo de prueba de discriminación es que la vacunación de un animal diana con una vacuna que tiene una función "marcadora" positiva o negativa puede diferenciarse serológicamente de la infección de un animal con el microorganismo de tipo silvestre. Por ejemplo, la vacuna marcadora puede ser deficiente en uno o más antígenos que están presentes en el  
15 microorganismo de tipo silvestre. Una diana infectada se volverá entonces seropositiva para ese antígeno, mientras que los vacunados permanecen seronegativos para ese antígeno.

Una clase de vacunas DAIV desarrolladas para su uso contra PPC se basa en subunidades virales tales como E2 y/o Erns. Sin embargo, éstas ofrecen menos protección, y tienen un inicio más lento de inmunidad que las vacunas de virus enteros.  
20

Asimismo, bajo un régimen de no vacunación y erradicación de PPC, la única manera que se permita la vacuna marcadora de VPPC en el mercado, reside en una combinación con una prueba de diagnóstico complementario fiable.  
25

En un esfuerzo por combinar en una vacuna una protección fuerte y temprana, así como la capacidad de DAIV, la vacuna contra VPPC viva atenuada de la cepa C existente se modificó con técnicas de ADN recombinante por Kortekaas *et al.* (2010, *J. of Virol. Methods*, vol. 163, pág. 175), con lo que se centraron en el epítipo TAVSPTTLR en el dominio A de la proteína E2 del VPPC. Algunos aminoácidos en el epítipo fueron mutados o delecionados,  
30 después de lo cual el virus del VPPC mutante se sometió a una evolución forzada del virus. Se obtuvieron virus mutantes viables que tienen diferentes mutaciones del epítipo TAVSPTTLR.

Entre las series de vF1c- $\Delta$ PT de mutantes de E2 del VPPC de la cepa C, se seleccionó uno para el estudio adicional, denominado: vF1c- $\Delta$ PTa1. Este virus tiene una versión mutada del epítipo TAVSPTTLR de E2, por sustitución de uno, y deleción de dos aminoácidos, el epítipo correspondiente al epítipo TAVSPTTLR original se convirtió entonces en: TAGSTLRTE (SEQ ID NO: 2). Este virus mutante mostró una buena viabilidad, y se indujo una fuerte respuesta de anticuerpos contra E2. Además, los anticuerpos de conejo contra E2 mutada ya no reconocen la E2 de tipo silvestre del virus de la cepa C parental. En consecuencia, éste fue considerado como el candidato ideal para una vacuna marcadora contra VPPC viva eficaz que permite DAIV.  
40

El virus mutante vF1c- $\Delta$ PTa1 se ensayó entonces para eficacia de la vacuna en el animal diana (Kortekaas *et al.*, 2011, *Vet. Microbiol.*, vol. 147, pág. 11), que se descubrió para inducir un nivel de protección cercano al de la cepa parental, e impidió de manera eficaz la liberación de virus provocadores. Sin embargo, los autores se sintieron decepcionados al descubrir que los sueros de los cerdos vacunados con este virus mutante no podían ser  
45 diferenciados claramente de sueros de cerdos vacunados con el virus de la cepa C parental. Esto se debe a que el virus mutante de E2 inducido en anticuerpos de cerdos dio puntuaciones de falsos positivos en la resistencia intermedia a completa en ELISA para E2. En consecuencia, esto descartó la introducción en el mercado de una nueva vacuna marcadora DAIV, a falta de una prueba de anticuerpos contra VPPC discriminatoria fiable.

50 Al tratar de superar las puntuaciones de falsos positivos en ELISA para E2 en sueros de cerdos vacunados con una vacuna marcadora, Kortekaas *et al.* (2011, *supra*) consideraron realizar varias modificaciones a ELISA, tales como: modificación de los péptidos usados mediante el uso de predicciones de la estructura terciaria; uso de nuevos anticuerpos monoclonales que permitirá una mejor diferenciación; cambio de ELISA usando diferentes anticuerpos de bloqueo, ya que había demostrado ser eficaz para otros (Holinka *et al.*, 2009, *Virology*, vol. 384, p 106); y cambio del valor de corte para la lectura, mientras se mantiene la sensibilidad aceptable. Se descubrió que todos estos enfoques son ineficaces para superar la aparición de falsos positivos.  
55

Como se ha indicado, los resultados de Holinka *et al.* (2009, *supra*) no mostraron resultados de falsos positivos en un ELISA para E2 similar, al someter a ensayo sueros de cerdos vacunados con un marcador de PPC recombinante diferente. Sin embargo, sus resultados no pueden ser considerados como significativos: por una parte, debido a que se sometieron a ensayo sueros agrupados en lugar de individuales, y por otra parte, debido a que sus lecturas se encuentran en el intervalo inferior de detección (entre 0,100 y 0,350 unidades de DO; véase Holinka *et al.*, 2009, *supra*; Figura 3A), en el que la relación señal a ruido es demasiado desfavorable para formar la base de una prueba de diagnóstico a gran escala fiable.  
60

65 Un mejor ejemplo es la publicación de Reimann *et al.* (2010, *Vet. Microbiol.*, vol. 142, pág. 45), que construyó una

vacuna contra PPC recombinante parecida a la de Holinka *et al.*, mediante el reemplazo del epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC con la secuencia correspondiente de E2 del VDVB. En línea con los resultados de Kortekaas *et al.* (2011, *supra*), Reimann *et al.* también descubrieron anticuerpos de reacción cruzada en el suero de cerdos vacunados con su virus de E2 mutado, que se unió al epítipo de E2 no modificado. Así, también en este caso, se obtuvieron puntuaciones de falsos positivos, y una prueba DAIV no podría desarrollarse. Para abordar este problema, Reimann *et al.* sugirieron la adaptación de los valores de corte a un costo a la sensibilidad, o la modificación de la secuencia de la estructura del virus mutante para reducir las puntuaciones de falsos positivos.

Por lo tanto, se descubrieron mutaciones diferentes en el epítipo TAVSPTTLR que causan los mismos problemas para una vacuna marcadora contra VPPC basada en un epítipo mutante de este tipo: en el caso de una vacuna contra VPPC basada en el virus vFlc- $\Delta$ PTa1, las mutaciones respecto al epítipo TAVSPTTLR cambiaron 6 de los 9 aminoácidos en ese locus. Del mismo modo, para Reimann *et al.* (2010, *supra*), se sometieron a ensayo 5 aminoácidos diferentes de los 9 en el locus correspondiente de la proteína E2, este problema también se produjo.

En consecuencia, el problema de las puntuaciones de falsos positivos en un ELISA para anticuerpos contra E2 del VPPC de tipo silvestre en sueros obtenidos de animales vacunados con una vacuna (marcadora) contra VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de la proteína E2 del VPPC, es por lo tanto de carácter general, y hasta la fecha, aún no se ha superado. En una revisión reciente de candidatos de vacunas contra PPC, Eblé *et al.* (2013, *Vet. Microbiol.*, vol. 162, pág. 437) confirman este dilema que para VPPC la combinación óptima de una vacuna contra VPPC y prueba DAIV correspondiente aún no están disponibles.

Es por tanto un objetivo de la presente invención superar las desventajas de la técnica anterior, y dar cabida a una necesidad en el campo mediante la reducción de los resultados falsos positivos en ensayos de diagnóstico para anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre, cuando se someten a ensayo muestras de animales que se vacunaron con una vacuna contra VPPC que tiene una mutación en el epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC.

Sorprendentemente, se descubrió que este objetivo se puede conseguir, y por consiguiente, las desventajas de la técnica anterior se pueden superar, mediante una prueba de diagnóstico mejorado para anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre, que permite DAIV. La mejora se refiere a la modificación de una etapa de incubación de un ensayo de diagnóstico para anticuerpos contra E2 del VPPC de tipo silvestre, en la que se incubaba una muestra de ensayo con un vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC, y en este momento incorpora la co-incubación con un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC. Se descubrió que esta modificación reduce por completo los resultados de falsos positivos, en solo una modificación limitada en el protocolo de un ensayo de diagnóstico existente para anticuerpos contra E2 del VPPC.

Los efectos ventajosos de este método de diagnóstico modificado son varios: el principal es que esta modificación puede ser integrada completamente en el protocolo de prueba existente. En consecuencia, no se requiere ninguna etapa de incubación adicional, y el método de ensayo mejorado no requiere más tiempo que antes. Esta es una ventaja significativa, considerando las cantidades potencialmente superiores de muestras de ensayo que pueden necesitar ser sometidas a ensayo en un tiempo corto en el caso de un brote de PPC en un área.

Además, ahora ya no es necesario realizar cambios drásticos en la vacuna contra VPPC correspondiente o en el ensayo de diagnóstico original. Por el contrario, ahora es posible usar la configuración básica de un ELISA para E2 del VPPC existente, para la detección de anticuerpos contra E2 del VPPC de tipo silvestre en muestras de animales vacunados con una vacuna contra VPPC. Esto permite que la dependencia de los ensayos de diagnóstico de VPPC establecidos con su fiabilidad probada, y los perfiles de especificidad y sensibilidad sean adecuadamente establecidos.

Con esta modificación, un ensayo de diagnóstico de VPPC se puede usar ahora para distinguir de manera eficaz los animales infectados de los vacunados, y de este modo, la invención proporciona una prueba de diagnóstico mejorado para VPPC de tipo silvestre, que permite la identificación sistemática DAIV, y se puede usar como diagnóstico complementario para una vacuna (marcadora) contra VPPC, para controlar la aparición de VPPC en una población susceptible de animales.

Una etapa importante para estos efectos ventajosos fue la identificación por parte del inventor de la causa del fracaso de discriminar la vacunación contra VPPC de la infección con VPPC de tipo silvestre, o con la vacuna contra la cepa C.

Se descubrió que esta causa era que una vacuna (marcadora) contra VPPC que comprende una E2 con un epítipo TAVSPTTLR mutado, induce anticuerpos que pueden unirse específicamente no solo al epítipo de E2 mutado de la vacuna, sino también - y con una elevada afinidad - al epítipo TAVSPTTLR sin modificar de E2 en VPPC de tipo silvestre, y en la vacuna contra la cepa C. Esto causó puntuaciones de falsos positivos cuando se someten a ensayo muestras de suero de animales vacunados para la infección por VPPC de tipo silvestre. En cambio, no se descubrió que los anticuerpos resultantes de la infección por VPPC de tipo silvestre, o la inoculación con una vacuna contra la cepa C, o anticuerpos monoclonales contra el epítipo TAVSPTTLR de E2 de tipo silvestre (p. ej., V2 (Prionics), A18 (IDEXX), o WH303 (Lin *et al.*, 2000, *supra*)), tuvieran cualquier afinidad significativa a la proteína E2 con un epítipo

TAVSPTTLR mutado de una vacuna contra VPPC. Esa fue la razón por la cual la co-incubación con un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR de proteína E2 del VPPC de tipo silvestre no resolvió el problema de las puntuaciones de falsos positivos contra la vacuna con el epítipo TAVSPTTLR mutado.

5 Actualmente se desconoce cómo o por qué se produce este fenómeno. Sin embargo, sin quedar ligado a teoría o modelo alguno que explicaría estas observaciones, el inventor especula que hay una influencia de la forma tridimensional del epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC; esta forma en 3D se cambia tras la mutación de su secuencia de aminoácidos lineal. Esto induce anticuerpos contra el epítipo de E2 mutante, que aparentemente todavía es capaz de unirse específicamente al epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC de tipo silvestre. Dichos anticuerpos tienen una reacción cruzada en un ensayo de diagnóstico basado en una proteína E2 del VPPC de tipo silvestre, causando puntuaciones de falsos positivos altamente específicas.

15 Con esta visión de la causa del problema de los resultados de las pruebas con falsos positivos, el inventor descubrió entonces de una manera sorprendente hacer frente a este problema, y fue capaz de implementar una solución en una etapa del protocolo de un ensayo de diagnóstico de E2 establecido: la etapa que consiste en incubar una muestra de ensayo con un vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de la proteína E2 del VPPC, y además: co-incubar un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de la proteína E2 del VPPC. Esto resuelve el problema de las puntuaciones de falsos positivos.

20 El hecho de que la modificación del método de diagnóstico pueda adoptar la forma de una co-incubación fue una sorpresa, ya que normalmente se esperaría que un procedimiento de este tipo sea perjudicial para la unión correcta y completa de los anticuerpos contra E2 del VPPC en la muestra de ensayo con el vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC, y de este modo, no será normalmente considerado por un experto.

25 Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención se refiere a un método de detección de anticuerpos contra el virus de la peste porcina clásica (VPPC) de tipo silvestre en una muestra de ensayo, en el que dicha muestra también puede comprender anticuerpos contra un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, comprendiendo el método una etapa que consiste en incubar dicha muestra de ensayo con un vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC, caracterizado por que el método comprende la co-incubación en dicha etapa con un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC.

30 El "método de detección", de acuerdo con la invención es un método *in vitro*, aplicado en una muestra de ensayo para determinar un valor o propiedad (a menudo denominado "biomarcador") de una muestra de ensayo, después de lo cual el resultado del ensayo puede ser interpretado para dar un cierto significado a su resultado. Esta interpretación se basa en la comparación del resultado obtenido para una muestra de ensayo usando el método, con un valor de referencia o de medición previa, y establece si el valor medido está presente o ausente, o ha aumentado o disminuido.

40 Para la invención, el valor medido es la presencia cualitativa y cuantitativa de anticuerpos específicos para el epítipo TAVSPTTLR de la proteína E2 del VPPC de tipo silvestre.

45 El método de acuerdo con la invención puede ser una prueba de diagnóstico en una de diferentes formas bien conocidas, p. ej., como: radioinmunoensayo, ensayo de inmunodifusión, ensayo de inmunofluorescencia, ensayo de inmunoprecipitación, ensayo por aglutinación, ensayo por hemólisis, ensayo de neutralización, "ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas" (ELISA), o AlphaLISA™.

50 Varios libros de texto describen la variedad de pruebas de diagnóstico que están disponibles y sus características específicas; por ejemplo: J. Huebner: *Antibody-antigen interactions and measurements of immunologic reactions* (Capítulo 9 en: Pier, Lyczak y Wetzler (eds.): *Immunology, infection, and immunity*, ASM Press, Washington D.C., 2004, ISBN: 1555812465, págs. 207-232); *'Antibodies: A Laboratory Manual'* (eds.: Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988, ISBN-10: 0879693142); e *'Immunoassays: A Practical Approach'* (J. P. Gosling ed., Oxford University press, 2000, ISBN-10: 0199637105).

55 Un gran número de empresas comerciales puede proporcionar materiales y reactivos para pruebas de diagnóstico, o kits de diagnóstico completos, o puede proporcionarse para la prueba y el análisis.

60 Está dentro de las capacidades habituales del experto idear y optimizar el protocolo, los materiales y las condiciones de un método de acuerdo con la invención.

65 Como también es bien conocido en la técnica, "anticuerpos" son proteínas inmunoglobulinas, y en general existen en 5 clases. Para la muestra de ensayo, los anticuerpos serán normalmente de tipo IgG o IgM, y son anticuerpos enteros. Sin embargo, los otros anticuerpos que se pueden usar como un reactivo en un método de acuerdo con la invención, por ejemplo como un anticuerpo secundario, o como anticuerpo marcado, no necesitan ser inmunoglobulinas enteras p. ej., un anticuerpo de cadena sencilla, o una parte de una inmunoglobulina; y también pueden tener una forma diferente: una construcción (sintética) de dichas partes, siempre que las partes de los

anticuerpos todavía contengan un sitio de unión al antígeno. Los subfragmentos bien conocidos de inmunoglobulinas son: fragmentos Fab, Fv, scFv, dAb, o Fd, dominios Vh, o multímeros de tales fragmentos o dominios.

5 Los anticuerpos para su uso como reactivo en ensayos de diagnóstico se producen comúnmente por (sobre)inmunización de un animal donante con el antígeno diana, y la recogida de los anticuerpos producidos a partir de suero del animal. Los donantes bien conocidos son conejos y cabras. Otro ejemplo es pollos que pueden producir altos niveles de anticuerpos en la yema de huevo, las denominadas IgY. Alternativamente, los anticuerpos pueden ser producidos *in vitro*, p. ej., mediante la conocida tecnología de anticuerpos monoclonales a partir de cultivos de linfocitos B inmortalizados (células de hibridoma), y para los que se conocen sistemas de producción a escala industrial. También anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden por sí mismos ser expresados en un sistema de expresión recombinante, a través de la expresión de los genes de cadena ligera y/o pesada Ig clonada. Todos estos son bien conocidos por el experto en la materia.

15 Para la invención y a lo largo de este texto, los anticuerpos serán referidos basándose en la diana contra la que se dirigen; p. ej., los anticuerpos contra VPPC se refieren como "anticuerpos contra VPPC", y "anticuerpos contra E2", son anticuerpos contra la proteína E2 más conocido como anticuerpos anti-E2, etc.

20 Como es bien conocido en la técnica, los anticuerpos dirigidos "contra" una cierta diana, son anticuerpos que son específicos para un epítipo en esa diana, por lo que la diana es una molécula o entidad particular. Un anticuerpo (o fragmento del mismo) es específico para un epítipo si es capaz de unirse de manera selectiva a ese epítipo.

25 Si la interacción entre un anticuerpo y una diana es específica y/o selectiva o no, puede ser fácilmente evaluada por un experto. Por ejemplo, la especificidad de los resultados de un inmunoensayo basado en la inhibición se puede determinar demostrando que la inhibición se correlaciona con la concentración del antígeno o del anticuerpo usado en el ensayo. Usando p. ej., un ensayo de unión competitiva, se puede determinar la cantidad de antígeno que se requiere para inhibir la unión del anticuerpo a este antígeno recubierto en un 50 % (Bruderer *et al.*, 1990, *J. of Imm. Meth.*, vol. 133, pág. 263). Como un ejemplo para el presente caso: el uso de la proteína E2 del VPPC de tipo silvestre y el anticuerpo (monoclonal) específico al epítipo TAVSPTLLR.

30 Muy relevante en el contexto de un inmunoensayo de diagnóstico, es cuando un anticuerpo demuestra una unión de falsos positivos, que conduce a resultados de falsos positivos del ensayo de diagnóstico. Esto puede ser causado por una unión relativamente fuerte a un epítipo distinto del que el anticuerpo se genera en contra, o por una unión específica a su epítipo de origen, pero entonces situado en una diana diferente a la diana de origen.

35 Un experto en el campo de las técnicas de inmunoensayo sabe cómo diferenciar resultados verdaderos y falsos positivos, por ejemplo, mediante la confirmación de los resultados con un tipo diferente de ensayo de diagnóstico, o la confirmación del resultado con una muestra de ensayo a partir de un punto temporal diferente.

40 Por el método de acuerdo con la invención, se pueden obtener reducciones significativas en las puntuaciones de los falsos positivos cuando se someten a ensayo anticuerpos contra la proteína E2 del VPPC de tipo silvestre. Como se describe y ejemplifica en la presente memoria, la reducción de las puntuaciones de los falsos positivos se ha alcanzado hasta 5 veces (p. ej., a partir de más del 50 % de inhibición de ELISA, menos del 10 % de inhibición), y una reducción de hasta el 100 % del número de animales considerados incorrectamente positivos en VPPC.

45 En varias pruebas usando un método de acuerdo con la invención, todos los sueros de cerdos infectados por VPPC de tipo silvestre fueron calificados como positivos, basándose en los resultados de la prueba, desde aproximadamente 3 semanas después de la infección, mientras que ninguno de los sueros de animales vacunados repetidamente con una vacuna basada en vFlc-ΔPTa1 llegó a ser positivo después de la tercera vacunación, hasta el último punto temporal medido.

50 El método de acuerdo con la invención también se ensayó en un gran conjunto de aproximadamente 900 muestras de ensayo de la colección del Instituto Central de Veterinaria (Lelystad, Países Bajos), que comprende anticuerpos contra VPPC que eran elevados, bajos, negativos, o sospechosos, así como un número de sueros que contienen anticuerpos contra VEF o VDVB, e incluso algunas infecciones mixtas de VPPC, VEF, y/o VDVB. Por el método de acuerdo con la invención, casi todas las muestras pudieron ser identificadas correctamente, con excelente especificidad y sensibilidad, véanse los Ejemplos de aquí en adelante.

60 De hecho, cuando se somete a ensayo la colección de 900 muestras, incluso se observó una sensibilidad potenciada para la mayoría de las muestras ensayadas cuando se aplica la co-incubación con el método de acuerdo con la invención. Esto significa que el porcentaje de inhibición observado en un ELISA tipo bloqueo para anticuerpos contra E2 del VPPC de tipo silvestre fue mayor para varias de las muestras cuando se aplicó el método de acuerdo con la invención, en comparación con la aplicación de un ELISA tipo bloqueo para anticuerpos contra E2 del VPPC comerciales convencionales. Esto dio como resultado ahora 5 muestras indicadas previamente como sospechosas al dar un resultado positivo, y dos muestras previamente negativas ahora con calificaciones sospechosas (véase el Ejemplo 2.3, y la Tabla 2).

Para la invención, virus de la peste porcina clásica de "tipo silvestre" se refiere a un VPPC, como se produciría en la naturaleza. Esto no significa que tales VPPC de tipo silvestre sean todos idénticos, ya que muchas variaciones en la composición genética y características biológicas son concebibles o ya conocidas. Sin embargo, este término tiene por objeto excluir para su uso en la invención, los VPPC que son el resultado de la intervención humana, tal como por modificación o mutación, por ejemplo, mediante pases repetidos o por adaptación de su ácido nucleico por técnicas de ADN recombinante.

Para la invención, "virus de la peste porcina clásica" o "VPPC" se refiere generalmente a los virus del género taxonómico *Pestivirus*, que tiene las características bien conocidas del VPPC. Esto incluye también que los VPPC están subclasificados de cualquier manera, por ejemplo, como una subespecie, cepa, aislado, genotipo, serotipo, serovar, serogrupo, variante, o subtipo y similares. Dichos VPPC comparten los rasgos caracterizadores de sus miembros de la familia taxonómica, tales como las características genómicas, físicas, electrónicas-microscópicas, y bioquímicas, así como características biológicas, tales como comportamiento fisiológico, inmunológico, o patogénico. Junto a la clasificación serológica, otras determinaciones pueden basarse en ensayos de secuenciación de nucleótidos o de PCR, como se conoce en el campo.

Resultará evidente para un experto que, si bien la especie viral que es un sujeto de la presente invención se denomina actualmente VPPC, esta es una clasificación taxonómica que podría estar sujeta a cambios ya que nuevas percepciones conducen a la reclasificación en un grupo taxonómico nuevo o diferente. Sin embargo, puesto que esto no cambia el microorganismo involucrado o sus características caracterizadoras, solo su nombre científico o clasificación, tales organismos reclasificados permanecen dentro del alcance de la invención.

La "muestra del ensayo" para su uso en el método de acuerdo con la invención, puede ser en principio cualquier tipo de muestra que contiene anticuerpos, por ejemplo, una muestra de plasma o suero preparada a partir de una muestra de sangre entera procedente de un animal. El experto es muy consciente de las técnicas y materiales necesarios para obtener y preparar dicha muestra de plasma o suero procedente de un animal.

Se prefiere una muestra de suero, ya que es más limpia, y se puede preparar mediante técnicas convencionales de laboratorio, por ejemplo que comprenden las etapas que consisten en: coagulación, centrifugación, e inactivación del complemento.

Opcionalmente, la muestra de ensayo puede ser procesada o purificada adicionalmente, p. ej., para mejorar la intensidad de la señal, o para reducir la señal de fondo. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden aislar. Las técnicas bien conocidas para la purificación de anticuerpos son, por ejemplo, la precipitación de tales anticuerpos usando ácido caprílico o sulfato de amonio o el uso de cromatografía de afinidad.

Para la invención, el término "comprende" (así como variaciones tales como "que comprende", "comprende", y "comprendido"), como se usa en la presente memoria, se refiere a todos los elementos, y a cualquier combinación posible concebible para la invención, que están cubiertos o incluidos en la sección del texto, párrafo, reivindicación, etc., en el que se usa este término, incluso si tales elementos o combinaciones no se recitan explícitamente; y no se refiere a la exclusión de cualquiera de tales elementos o combinaciones. En consecuencia, cualquier sección de texto, párrafo, reivindicación, etc., también puede referirse a una o más realizaciones en las que el término "comprende" (o sus variaciones) se sustituye con términos tales como "consiste en", "que consiste en" o "que consiste esencialmente en".

Un "epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC" se refiere con ese nombre al epítipo bien conocido en el dominio A de la proteína E2 del VPPC, y es un epítipo lineal de 9 aminoácidos de longitud. Resultará evidente para un experto que el nombre "TAVSPTTLR" dado a este epítipo coincide con la secuencia de aminoácidos de este epítipo cuando está presente en una letra del código convencional UIQPA, en el que treonina se denomina como T, alanina como A, etc.

El epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC se conserva en VPPC de tipo silvestre (Lin *et al.*, 2000, *supra.*), y su secuencia de aminoácidos está representada en la presente memoria como la SEQ ID NO: 1.

Para la invención, un epítipo TAVSPTTLR "mutado" de E2 del VPPC difiere en su secuencia de aminoácidos en al menos una posición de la SEQ ID NO: 1. La mutación puede afectar a un solo cambio o a múltiples, y puede ser una inserción, una delección o una sustitución, de un aminoácido, o una combinación de los mismos.

Un ejemplo de un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, para su uso en el método de acuerdo con la invención, es el epítipo correspondiente presente en la proteína E2 de un virus VPPC mutante, tal como vFlc- $\Delta$ PTa1, en el que este epítipo es: TAGSTLRTE (SEQ ID NO: 2). Otro ejemplo es un VPPC recombinante que se describe por Reimann *et al.* (2010, *supra.*), p. ej., virus pA/CP7\_E1E2alf\_TLA, en el que el epítipo correspondiente es TLANKDTLA (SEQ ID NO: 3).

Un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, para uso en el método de acuerdo con la invención, se puede obtener de varias fuentes, ya sea natural o sintética. Más conveniente es introducir una mutación en el epítipo

TAVSPTTLR de una E2 del VPPC por intervención humana, tal como mediante modificación o mutación, por ejemplo mediante la adaptación de la secuencia de nucleótidos codificante por medio de tecnología de ADN recombinante, seguido de la expresión de una proteína (p. ej., una proteína E2 del VPPC o una parte de la misma) que comprende el epítipo mutado en un sistema de expresión recombinante *in vitro*.

5 Para la invención, "incubar" se refiere a lo que permite la unión entre un anticuerpo y su epítipo específico. Esto requerirá condiciones de reacción que son propicias a la formación de tales interacciones moleculares, y comprenderán el uso de los tampones, temperatura y duración correctos. Los materiales y métodos de incubación para la invención se describen en los manuales bien conocidos, y en las instrucciones proporcionadas por los  
10 proveedores de pruebas comerciales.

Un "vehículo", en el contexto de la presente invención se refiere a una estructura macromolecular que puede transportar y presentar un epítipo de la proteína E2 del VPPC. En principio, cualquier estructura puede ser adecuada, siempre que el epítipo sea accesible para la unión con un anticuerpo. El vehículo puede tener un origen  
15 biológico o mineral, natural o sintético, grande o pequeño, y puede ser por ejemplo una partícula de metal, un polímero, una proteína, o un hidrato de carbono. El epítipo puede estar fijado por enlaces covalentes, o por enlaces no covalentes, incluyendo cualquier tipo de interacción iónica, electrostática, hidrodinámica, o molecular. El epítipo está comprendido dentro o sobre el vehículo, y por lo tanto puede ser parte de éste, por ejemplo, como un elemento interno en una proteína, o como una proteína de fusión. El vehículo también puede contener otras moléculas o  
20 grupos, tales como una cuando una proteína que comprende el epítipo es una lipo- o glicoproteína, o un conjugado, etc. Los métodos de fijación del epítipo a un vehículo son bien conocidos en la técnica, y pueden comprender técnicas de ADN recombinante o bioquímicas.

Para la invención, una proteína es una cadena molecular de aminoácidos. La proteína puede ser una proteína nativa  
25 o madura, una pre- o pro-proteína, o un fragmento inmunogénico de una proteína. Entre otras cosas: péptidos, oligopéptidos y polipéptidos están incluidos dentro de la definición de proteína.

El vehículo para la invención es "inmovilizado", que significa: fijado a una fase sólida, por unión covalente o no  
30 covalente, tal como mediante adsorción o recubrimiento o similares. Esto no implica que la propia fase sólida sea inmóvil. La fase sólida puede ser en principio cualquier soporte sólido, siempre que permita la realización del método para la detección de acuerdo con la invención, y puede ser de diferente tamaño, tipo o forma, por ejemplo una placa, una partícula, una membrana etc.

Los métodos y materiales para la inmovilización de un vehículo en una fase sólida son bien conocidos en la técnica,  
35 y pueden p. ej., implicar el uso de un tampón carbonato y un valor de pH básico. Alternativamente, la inmovilización puede efectuarse p. ej., a través de una reacción química causando un enlace covalente, o mediante biotilación de un vehículo y la unión a un soporte sólido recubierto con avidina.

Preferentemente, la fase sólida es un pocillo de una placa de microtitulación, o una perla portadora para su uso en  
40 un ensayo AlphaLISA.

Para la invención, "co-incubación", indica que un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC se incuba junto con un vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC y una muestra de ensayo. En la práctica, esto significa que un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR  
45 mutado de E2 del VPPC está presente en la mezcla de incubación que se aplica en la etapa que consiste en incubar un vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC y una muestra de ensayo, para al menos una parte sustancial del tiempo que se requiere para esa incubación. El tiempo que constituye "una parte sustancial" depende de los detalles del protocolo particular para el ensayo de diagnóstico empleado. Por ejemplo, las instrucciones del fabricante de IDEXX CSFV Ab test, indican que el periodo de tiempo para la etapa que consiste  
50 en incubar la muestra de ensayo y la proteína E2 inmovilizada es de 2 horas o durante la noche (12-18 horas).

Para la invención "una parte sustancial del tiempo" se refiere a al menos el 25 % del tiempo para la etapa que  
55 consiste en incubar un vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC y la muestra de ensayo. Preferentemente, el 50 % del tiempo, más preferentemente 75, 90, 95, 99, o 100 % del tiempo, en ese orden de preferencia.

Esta co-incubación establece el método de acuerdo con la invención, aparte de una incubación que pueda ser  
60 considerada como una pre-incubación, que podría emplear una etapa distinta y adicional para la incubación de una muestra de ensayo y un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado, y que se realizaría antes de la incubación con el vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC. Dicha pre-incubación sería la opción estándar para un experto al optimizar los protocolos de incubación, ya que permite buenas posibilidades de control para la reducción de las reacciones de unión no deseadas. Sin embargo, el sorprendente hallazgo de la presente invención es que estas incubaciones pueden ser integradas ventajosamente en una etapa como una co-incubación, sin efecto perjudicial para la selectividad y especificidad de la prueba.

65 Como se ha descrito, una de las ventajas destacables es que la co-incubación no requiere tiempo adicional para el

ensayo de diagnóstico que se va a realizar. Una ventaja adicional es que el protocolo básico de un ELISA para E2 comercial convencional puede ser usado sin modificaciones significativas en los componentes de ensayo o su protocolo.

- 5 En una realización del método de acuerdo con la invención, la detección se efectúa por inmunoensayo enzimático, más preferentemente por ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas).

Los ELISA son bien conocidos, y se conocen varios tipos de formato y protocolo. Las ventajas generales son que proporcionan resultados rápidos y fiables, y pueden ser fácilmente ampliados.

- 10 En una realización preferente del método de acuerdo con la invención, el ELISA es un ELISA tipo bloqueo indirecto. Como se conoce en la técnica, esto implica que un anticuerpo de una muestra de ensayo compite con un anticuerpo detector marcado por la unión a un epítipo inmovilizado. Cuantos más anticuerpos estén presentes en la muestra de ensayo, más de ellos se unen al epítipo inmovilizado, y menos anticuerpos marcados pueden retenerse, resultando en una reducción (inhibición) del nivel máximo de la unión al marcador.

Un protocolo a modo de ejemplo para un método de acuerdo con la invención en el que la detección se efectúa mediante ELISA de bloqueo indirecto, puede comprender algunos o todas las etapas consecutivas para:

- 20 - revestimiento de un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC en una fase sólida,  
 - co-incubación de una muestra de ensayo y un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, con el vehículo recubierto, seguido por lavado,  
 - incubación con un anticuerpo secundario marcado, seguido por lavado,  
 - coloración de reacción, y  
 25 - lectura de los resultados.

Algunas de las etapas se pueden realizar por separado, o por partes diferentes. Por ejemplo, cuando se aplica como una prueba comercial, un proveedor comercial puede proporcionar una fase sólida pre-revestida, lista para su uso en la co-incubación con una muestra de ensayo.

- 30 Opcionalmente, el protocolo puede contener adicionalmente una o más etapas para el bloqueo de reacciones de unión de falsos positivos. Normalmente, esto implica la incubación con un exceso de una proteína no específica en un tampón usado para las etapas de incubación y/o lavado, p. ej., leche desnatada, o seroalbúmina.

- 35 Un ELISA puede ser optimizado aún más por la adaptación de sus reactivos y etapas de proceso, tales como la temperatura y la duración de las etapas de incubación; la especificidad y el tipo del anticuerpo o antígeno usado para la inmovilización o para la detección; la cantidad y el método de inmovilización aplicada; y la composición de los tampones de incubación y de lavado usados.

- 40 Las referencias generales a los inmunoensayos enzimáticos existen en varias publicaciones, entre otros en los libros de texto de laboratorio convencionales, tales como: *The Immunoassay Handbook* (4ª ed.: *Theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques*; D. G. Wild ed., 2013, ISBN-10: 0080970370); y *The ELISA Guidebook* (*Methods in Molecular Biology*, vol. 149, J. R. Crowther, Humana Press, 2000, ISBN10: 0896037282). Las alternativas son manuales de los proveedores comerciales tales como: "*Technical guide for ELISA*", KPL Inc., Gaithersburg, MD, EE. UU., 2013; y "*Assay guidance manual*" de Eli Lilly & Co., capítulo: *Immunoassay methods*, K. Cox *et al.*, mayo de 2012.

- 50 En una realización preferente adicional, el ELISA de la invención es esencialmente similar a un ELISA comercial para anticuerpos contra E2 del VPPC, por ejemplo para el ELISA PrioCHECK® CSFV Ab 2.0, anteriormente llamado ELISA Ceditest® CSFV 2.0, ambos disponibles en Prionics AG (Schlieren-Zúrich, Suiza), o IDEXX CSFV Ab Test, disponible en IDEXX Europe B.V. (Hoofddorp, Países Bajos). "Esencialmente similar" a este respecto se refiere al protocolo y a los materiales usados para estas pruebas comerciales.

- 55 Los protocolos alternativos para un método de acuerdo con la invención también se pueden idear. Por ejemplo, el método de acuerdo con la invención puede ser puesto en marcha basándose en las características del protocolo de una prueba de AlphaLISA, bien conocida en la técnica. En tal prueba, no se requieren etapas de lavado y mientras que el ensayo se puede realizar manualmente, se prefiere un AlphaLISA automatizado.

- 60 Las características de un protocolo AlphaLISA son que un antígeno (en este caso, un vehículo que comprende el epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC) y un anticuerpo (en este caso, un anticuerpo (monoclonal) específico para el epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC) se unen a perlas portadoras, y su unión es detectable por emisión de luz.

- 65 El vehículo que comprende el epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC puede por ejemplo ser biotinilado e inmovilizado en una perla aceptora recubierta con avidina, y se usa junto con un anticuerpo que está conjugado a perlas donantes. Una etapa en una prueba de AlphaLISA comprendería entonces la co-incubación de perlas aceptoras recubiertas con el vehículo que comprende el epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC con una muestra de

ensayo y un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC. A la inversa (el vehículo que comprende el epítipo que comprende TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC está recubierto), o una forma intermedia, con la cual se recubren ambos vehículos, es igualmente factible. La siguiente etapa podría ser entonces una incubación con perlas donantes recubiertas con anticuerpo, y, finalmente, la lectura de los resultados.

5 Por lo tanto, en una realización del método de acuerdo con la invención, la detección se efectúa mediante una prueba de diagnóstico que tiene las características de un AlphaLISA®.

10 El método de acuerdo con la invención es más ventajoso para el ensayo de muestras derivadas de los animales que son susceptibles a la infección por VPPC. Estos son varios animales de la familia de la especie porcina.

Por lo tanto, en una realización del método de acuerdo con la invención, la muestra de ensayo se deriva de un animal de la especie porcina.

15 Para la invención "porcino" se refiere a animales de la familia de los suidos, y preferentemente a animales del género Sus, por ejemplo: un cerdo silvestre o doméstico, puerco, guarro, jabalí, babirusa, o facóquero. Esto también incluye porcinos indicados por un nombre arbitrario en referencia a su sexo o edad, tales como: cerda, verraco, lechona, cochinitos destetados, o lechón.

20 Una aplicación ventajosa adicional del método de acuerdo con la invención se encuentra en las muestras de ensayo de animales de la especie porcina que habían sido vacunados contra VPPC con una vacuna marcadora contra VPPC.

25 Como es bien conocido y se ha descrito anteriormente, el antígeno en una vacuna marcadora que difiere antigénicamente del antígeno de tipo silvestre se basa, por ejemplo, en que carece un epítipo, o tiene una versión diferente de un epítipo en comparación con la versión de tipo silvestre. Normalmente, un antígeno en una vacuna marcadora ha sido adaptado o modificado por técnicas bioquímicas o de ADN recombinante, y el resultado es que una respuesta de anticuerpos contra el antígeno modificado de la vacuna marcadora puede diferenciarse de una respuesta de anticuerpos al antígeno de tipo silvestre no modificado. Esto permitirá la "diferenciación de los animales infectados de los vacunados" serológica o DAIV.

Por lo tanto, en una realización del método de acuerdo con la invención, la muestra de ensayo se deriva de un animal de la especie porcina que había sido vacunado contra VPPC con una vacuna marcadora contra VPPC.

35 Una aplicación particularmente favorable del método de acuerdo con la invención se hace evidente cuando la vacuna (marcadora) contra VPPC comprende como antígeno de VPPC una proteína E2 del VPPC que se desvía de la E2 de tipo silvestre por una mutación en el epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC. Como se ha descrito anteriormente, en muestras de los animales vacunados con una vacuna de este tipo, las puntuaciones de falsos positivos se descubrieron usando las pruebas de diagnóstico existentes para anticuerpos contra VPPC. Sin embargo, el método de acuerdo con la invención mostró solo puntuaciones de verdaderos positivos. Esto tiene importantes implicaciones en la salud veterinaria y la economía de la porcicultura.

40 Por lo tanto, en una realización preferente del método de acuerdo con la invención, la muestra de ensayo se obtiene de un animal de la especie porcina que había sido vacunado contra PPC con una vacuna contra VPPC que comprende una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado.

50 Como se ha descrito anteriormente, en principio, muchas formas de un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC son concebibles para su uso en la co-incubación para el método de acuerdo con la invención. Sin embargo, este método se aplica más ventajosamente en caso de que el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC que se emplea en la co-incubación sea el mismo que el de una vacuna marcadora contra VPPC.

55 Por lo tanto, en una realización del método de acuerdo con la invención, el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC que está comprendido en el vehículo para su uso en la co-incubación para el método de acuerdo con la invención, es el mismo que el epítipo TAVSPTTLR mutado que está presente en la proteína E2 del VPPC de una vacuna marcadora contra VPPC.

Una consideración adicional se aplica al epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC en la vacuna marcadora contra VPPC, esta vacuna aún ha de ser capaz de inducir una respuesta inmunitaria eficaz contra el VPPC en un animal diana, a pesar de la mutación al epítipo TAVSPTTLR.

60 Para la invención, existe preferentemente una coincidencia entre, por una parte, el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC en la vacuna marcadora contra VPPC que se usa para vacunar a los animales de los que se deriva una muestra de ensayo que se va a ensayar en el método de acuerdo con la invención, y por otra parte el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC que está comprendido en el vehículo para su uso en la co-incubación del método de acuerdo con la invención.

65

Por lo tanto, en una realización del método de acuerdo con la invención, el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC que está comprendido en el vehículo para su uso en la co-incubación es el mismo que el epítipo TAVSPTTLR mutado comprendido en la proteína E2 del VPPC de una vacuna contra VPPC que se usó para vacunar a los animales de la especie porcina de los que procede la muestra de ensayo.

5 Un experto es perfectamente capaz de determinar qué epítipos TAVSPTTLR mutados permiten una vacuna marcadora contra VPPC que comprende una proteína E2 del VPPC que comprende tal epítipo mutado, para ser un inmunógeno eficaz. Por ejemplo, mediante el control de la respuesta inmunológica después de la vacunación, o después de una exposición a una infección, p. ej., mediante el control de los signos clínicos de la enfermedad diana, puntuación clínica, parámetros serológicos, o por el reaislamiento del patógeno, y la comparación de estos resultados con las respuestas observadas en animales vacunados simulados.

15 NB: Como el VPPC es altamente infeccioso, y es una enfermedad de declaración obligatoria en muchos países, cualquier uso de muestras de laboratorio o zootécnicas que contienen posiblemente VPPC infeccioso (ya sea de tipo silvestre o atenuado) ha de realizarse con las precauciones de bioseguridad apropiadas, en línea con las directrices nacionales o internacionales.

Ejemplos de vacunas contra VPPC que comprenden una proteína E2 del VPPC con un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC que puede ser adaptado al vehículo que comprende el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC para su uso en la co-incubación para el método de acuerdo con la invención, son conocidos en la técnica y se han descrito anteriormente. Por ejemplo, en Kortekaas *et al.* (2010, *supra*); un ejemplo es el VPPC mutante llamado vFic-ΔPTa1, que tiene una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado con la secuencia de aminoácidos: TAGSTLRTE, como se presenta en la SEQ ID NO: 2.

25 Otro ejemplo procede de Reimann *et al.* (2010, *supra*): el VPPC mutante denominado pA/CP7\_E1E2alf\_TLA, que tiene una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado con la secuencia de aminoácidos: TLANKDTLA, como se presenta en la SEQ ID NO: 3.

30 Por lo tanto, en una realización del método de acuerdo con la invención, el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC que está comprendido en el vehículo para su uso en la co-incubación tiene la secuencia de aminoácidos: TAGSTLRTE (SEQ ID NO: 2).

35 En una realización alternativa del método de acuerdo con la invención, el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC que está comprendido en el vehículo para su uso en la co-incubación tiene la secuencia de aminoácidos: TLANKDTLA (SEQ ID NO: 3).

40 En una realización adicional, la muestra de ensayo para la invención se deriva de un animal de la especie porcina que había sido vacunado con una vacuna contra VPPC de acuerdo como se describe en Kortekaas *et al.* (2011, *supra*), tal como una vacuna basada en un VPPC mutante llamado vFic-ΔPTa1, como se ha descrito anteriormente.

45 Por lo tanto, en una realización adicional del método de acuerdo con la invención, la vacuna contra VPPC se basó en el virus vFic-ΔPTa1.

50 Las dos realizaciones diferentes de un vehículo descrito para su uso en el método de acuerdo con la invención son: un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC, usado para inmovilizarse en una fase sólida, y un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, usado para la co-incubación. Estos vehículos pueden tener diferentes formas, y los vehículos para los epítipos TAVSPTTLR mutados y de tipo silvestre pueden ser del mismo o de tipo diferente; también pueden ser una entidad distinta, o puede ser la misma entidad, p. ej., un vehículo que comprende ambos tipos de epítipos TAVSPTTLR.

55 En una realización del método de acuerdo con la invención, ya sea el vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC, o el vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, es una proteína, o ambos vehículos son proteínas.

60 Estas proteínas pueden ser idénticas o diferentes.

65 En una realización preferente del método de acuerdo con la invención, ya sea el vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC, o el vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, es una proteína E2 del VPPC, o ambos vehículos son proteínas E2 del VPPC.

Aparte de tener un epítipo TAVSPTTLR de tipo silvestre o mutado, el resto de un vehículo de proteína E2 del VPPC también puede diferir en las secuencias de aminoácidos; varios ejemplos de E2 del VPPC han sido descritos en la literatura, y sus secuencias están disponibles a partir de bases de datos públicas, tales como GenBank™.

65 Cuando el vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC es una proteína E2 del VPPC, esto proporciona la mejor oportunidad para la detección de anticuerpos contra VPPC de la muestra de

ensayo.

Del mismo modo, cuando el vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, es una proteína E2 del VPPC, esto proporciona la mejor oportunidad para la captura de cualquier anticuerpo de reacción cruzada que puede estar presente en la muestra de ensayo animal, y que de otro modo causa resultados de falsos positivos. Esto es debido a que una proteína E2 del VPPC ofrecerá una presentación en 3D del epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC que más se acerque a la forma natural de este epítipo.

Por lo tanto, en una realización preferente del método de acuerdo con la invención, los vehículos son proteínas maduras completas E2 del VPPC.

Sin embargo, como se conoce en la técnica, la región transmembranal del extremo C-terminal, y de hecho la mitad del extremo C-terminal de E2, es menos relevante para la unión de anticuerpos (van Rijn *et al.*, 1994, *J. of Virology*, vol. 68, pág. 3934; Chang *et al.*, 2010, *Virus Res.*, vol. 149, pág. 183). En consecuencia, un experto será así capaz de desarrollar y optimizar un método de detección de anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre de acuerdo con la invención, en la que o bien uno, o ninguno de los vehículos es una proteína completa madura E2, pero una parte de la misma - que proporcionó el epítipo TAVSPTTLR (mutado) *per se* está todavía presente -, aún permite una buena detección de anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre, y una buena reducción de las puntuaciones de falsos positivos, en el contexto del método de acuerdo con la invención.

El uso de una proteína del VPPC, o una parte de la misma, como un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR (mutado) de E2 del VPPC en el método de acuerdo con la invención, puede optimizarse adicionalmente variando las cantidades y condiciones de la co-incubación. Por ejemplo, el inventor ha expresado la proteína E2 del VPPC con un epítipo TAVSPTTLR mutado en el sistema de vector de expresión de baculovirus bien conocido, purificó la proteína, y usó la proteína E2 recombinante expresada para los ensayos de co-incubación.

La pureza y la cantidad de la proteína E2 expresada se pueden evaluar, por ejemplo por electroforesis en gel SDS, tinción de proteínas, y la cuantificación por fotodensitometría. Una alternativa es la cuantificación en un ELISA, usando un anticuerpo que se une a la E2, a través de otro epítipo TAVSPTTLR, y muestras de referencia de concentración conocida.

Dependiendo de la pureza de la proteína, la cantidad del vehículo de la proteína E2 que comprende un epítipo TAVSPTTLR (mutado) se elige para obtener una óptima detección de anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre, mientras que proporciona una reducción óptima de las puntuaciones de falsos positivos. Como se ejemplifica en la presente memoria, se requiere normalmente menos de 2 µg de proteína E2 por pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las cantidades de 1 µg o incluso 0,5 µg por pocillo también fueron eficaces.

Como se describe, las pruebas de diagnóstico comerciales existentes para los anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre han establecido su fiabilidad basándose en un gran cuerpo de datos de prueba para la determinación de sus perfiles de sensibilidad y especificidad. Esto es mantenido por conjuntos internacionalmente reconocidos de muestras de referencia positiva y negativa convencionales. La confianza en esta combinación de muestras de ensayo y de referencia es la base para su autorización de comercialización, y su uso en la certificación de exportación controlada por el gobierno de los animales sometidos a ensayo con tales ensayos.

A fin de que el método de acuerdo con la invención consiga la plena integración con los valores de referencia y las puntuaciones antes de la prueba de tales ensayos establecidos, se puede realizar una adaptación adicional para el protocolo de ensayo. En particular, las condiciones de incubación en el protocolo de ensayo se pueden adaptar para dar cabida al componente adicional en la etapa de co-incubación en la que se introduce el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC.

El inventor ha descubierto que sin la adaptación de las condiciones de incubación de dicha etapa, el método de acuerdo con la invención es todavía funcional, y altamente eficaz en la reducción de las puntuaciones de falsos negativos; sin embargo, cuando se someten a ensayo muestras convencionales establecidas usando el método de acuerdo con la invención, a continuación, las puntuaciones de DO precisas obtenidas pueden desviarse de los resultados previos de dichas normas, ya sean mayores o menores. Esto se debe a que la adición de un compuesto adicional puede requerir una determinada cantidad de volumen de líquido que se añade a la mezcla de incubación, esto puede causar una dilución del tampón de incubación y pueden incluirse los componentes, tales como sales, estabilizadores, detergentes o agentes de bloqueo, lo que resulta en una desviación de puntuaciones convencionales.

Por lo tanto, en una realización, el método de acuerdo con la invención comprende la adaptación de las condiciones de incubación de la etapa que comprende la co-incubación con un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, para ajustar la adición de dicho vehículo.

Hay varias maneras en que esta "adaptación" se puede realizar. La más directa es tomar una solución que comprende un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC en un tampón de

incubación para su uso en el método de acuerdo con la invención, mediante el cual el tampón de incubación se encuentra en una concentración aumentada en comparación con su concentración final cuando se usa en el método. Por ejemplo, cuando se combinan volúmenes idénticos de una solución que comprende un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, y de tampón de incubación, a continuación, el tampón de incubación se puede proporcionar como una solución madre a 2x la concentración de su uso final. También puede ser necesario para corregir cualquier sal o tampón que ya están presentes en la solución que comprende el vehículo que comprende el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC. Este principio se adapta fácilmente a otras relaciones de volumen y concentraciones correspondientes para la solución madre de tampón de incubación.

5  
10 Alternativamente, una solución lista para su uso pre-mezclada puede estar provista de un tampón de incubación ya que comprende un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, en el que el tampón de incubación está en su concentración de uso final.

15 Los ejemplos previos se basaron en proporcionar el vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC en una solución. Sin embargo, como este puede no ser óptimo para la estabilidad de la proteína, una alternativa es proporcionar la proteína que comprende el epítipo mutado de E2 del VPPC en un recipiente distinto en forma liofilizada, junto a un recipiente de tampón de incubación en la concentración de uso final. Cuando la proteína es luego reconstituida con el tampón de incubación poco antes del uso, esto no afecta a la estabilidad de la proteína, y la reconstitución no cambia (notablemente) la concentración del tampón de incubación.

20 Un experto será capaz de diseñar y optimizar otras combinaciones para llegar a soluciones similares.

Como se describe, una manera favorable de aplicar un método de acuerdo con la invención es mediante el uso de un kit de prueba de diagnóstico, que comprende los diversos componentes necesarios para aplicar el método.

25 La invención se refiere a un kit de prueba de diagnóstico para la implementación de un método de acuerdo con la invención.

30 Para la invención, el "kit de prueba de diagnóstico" se refiere a un kit de piezas para realizar el método de acuerdo con la invención. El kit comprende uno o más de los componentes para la aplicación del método, en particular: un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC que está inmovilizado en una fase sólida, y un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC. Estos deben venir en una forma y recipiente convenientes, opcionalmente con tampones para dilución de la muestra y la incubación, bloqueo, o lavado, y opcionalmente instrucciones de cómo realizar el método, y la forma de leer e interpretar los resultados.

35 El kit puede comprender un recipiente que tiene múltiples pocillos, tal como una placa de microtitulación. Los pocillos del recipiente pueden ser tratados para contener uno o más componentes para su uso en el método de acuerdo con la invención.

40 En el kit de prueba de diagnóstico de acuerdo con la invención, una proteína E2 del VPPC con un epítipo TAVSPTTLR se inmoviliza en los pocillos de una placa de microtitulación.

45 Las instrucciones opcionalmente comprendidas en el kit de prueba de diagnóstico para la invención, por ejemplo, puede ser escritas en una caja que contiene los constituyentes del kit; pueden estar presentes en un folleto en la caja; o pueden ser visibles en, o descargables desde, un sitio web del distribuidor del kit, etc.

50 Para la invención, el kit de ensayo de diagnóstico también puede ser una oferta de las partes mencionadas (en relación con la venta comercial), por ejemplo en un sitio web, para el uso combinado en un ensayo que comprende el método de acuerdo con la invención.

55 Un kit de prueba para la invención puede basarse en uno de los kits de prueba comerciales conocidos para anticuerpos contra E2 del VPPC de tipo silvestre, es decir, ser esencialmente el mismo que, por ejemplo, PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 (Prionics), o IDEXX CSFV Ab Test® (IDEXX), con modificación para ajustar la co-incubación con el componente adicional. La modificación puede relacionarse con las instrucciones de los usuarios modificadas, para proporcionar instrucciones para la co-incubación. Además, el kit puede proporcionar adicionalmente un recipiente que comprende una preparación liofilizada que comprende un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, que se vuelve a suspender p. ej., en tampón de incubación. Alternativamente, el kit de prueba puede comprender un recipiente con una solución madre de tampón de incubación a una concentración que es superior a su concentración de uso final, y un recipiente que comprende una solución que comprende un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, para su uso con la solución madre de tampón de incubación en la co-incubación. Otras realizaciones para incorporar los componentes del kit de prueba de diagnóstico para la invención son concebibles por un experto.

65 El kit de prueba para la invención comprende un recipiente que comprende un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC para la co-incubación en un método de acuerdo con la invención, o en un kit de prueba de diagnóstico de acuerdo con la invención.

5 Dicho uso proporciona la detección de anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre en muestras de ensayo animal, especialmente para muestras de animales que habían sido vacunados contra la PPC con una vacuna contra el VPPC que comprende una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado. Este uso proporciona una reducción de cualquier puntuación de falsos positivos, como se describe.

10 En una realización, el uso de acuerdo con la invención se refiere al uso de un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC. Preferentemente, el vehículo es una proteína, y preferentemente la proteína es una proteína E2 del VPPC, y preferentemente la proteína E2 del VPPC es una proteína madura completa.

15 Una aplicación ventajosa adicional del método de detección de acuerdo con la invención reside en su aplicación a un enfoque DAIV para la vacunación y detección contra VPPC. Esto permite diferenciar los animales que son vacunados contra el VPPC de los que están infectados por el VPPC. Es solo con el método de acuerdo con la invención, y la posterior eliminación de las puntuaciones de falsos positivos, que es posible una diferenciación serológica de esta manera, cuando la vacunación se realizó por el uso de una vacuna contra la PPC que comprende una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado.

20 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método de acuerdo con la invención para diferenciar los animales infectados por VPPC de tipo silvestre de los animales que fueron vacunados contra VPPC con una vacuna contra VPPC, por lo que la vacuna comprende una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado.

25 El método de acuerdo con la invención de diferenciación, es un método para el diagnóstico *in vitro*, que usa muestras de ensayo de los animales como se ha descrito anteriormente. El experto se dará cuenta de que el método de diferenciación de acuerdo con la invención como tal, implica resultados en las puntuaciones de diagnóstico para las muestras de ensayo investigadas. En particular la detección de anticuerpos de proteína E2 del VPPC, ya sea por su presencia o ausencia, o su nivel en valor absoluto o un valor relativo en comparación con el valor de una muestra de control.

30 De entrada, el método es una muestra de ensayo de un sujeto; el sujeto es preferentemente un animal de la especie porcina; la muestra de ensayo es preferentemente una muestra de sangre, más preferentemente una muestra de suero o plasma.

35 Con el fin de marcar la diferenciación final entre los animales infectados de los vacunados, las puntuaciones de las pruebas deben interpretarse como positivas o negativas; en la práctica esto significa: por encima o por debajo de un cierto umbral. Esto convenientemente se puede hacer mediante la incorporación en la prueba de un número de muestras de referencia convencionales a ensayar junto con las muestras de ensayo. Esto se describe en los Ejemplos. La muestra de referencia positiva y negativa se puede preparar en animales, o se puede obtener de varias instituciones y laboratorios de referencia, por ejemplo, el Laboratorio Comunitario de Referencia para la PPC, en la Universidad de Medicina Veterinaria de Hannover, Alemania.

45 Después de puntuar las muestras de ensayo como positivas, negativas, o sospechosas, esto puede ser extrapolado para diagnosticar el animal donante del que se obtuvo la muestra de ensayo, como positivo, negativo, o sospechoso de infección con VPPC de tipo silvestre.

50 En caso de que el animal sea diagnosticado como positivo (o sospechoso), entonces, - en línea con las normativas reguladoras - el animal puede ser tratado mediante vacunación y/o anular la cuarentena, o ser sacrificado de una manera responsable.

Por lo tanto, en una realización del método de diferenciación de acuerdo con la invención, el método comprende también una o más etapas seleccionadas entre las siguientes:

- 55
- una etapa de obtención de una muestra de ensayo
  - una etapa de interpretación de los resultados de prueba obtenidos, por comparación con los resultados de las muestras de referencia positiva y negativa.
  - una etapa de comparación de los resultados de prueba obtenidos de la muestra con un valor de corte predeterminado,
  - 60 - una etapa de puntuación de una muestra como positiva, negativa, o sospechosa de contener anticuerpos contra el VPPC de tipo silvestre,
  - una etapa de diagnóstico de un donante de la muestra como positiva, negativa o sospecha de infección por VPPC de tipo silvestre, o
  - 65 - una etapa de (recomendación) tratamiento de un donante de la muestra, basándose en un resultado positivo o sospechoso del diagnóstico de infección por VPPC de tipo silvestre, por vacunación, cuarentena, y/o sacrificio.

En una o más realizaciones preferentes, la muestra es una muestra de suero, o los resultados de la prueba son puntuaciones de porcentajes de inhibición de ELISA.

5 En una realización preferente, la muestra de ensayo se deriva de un animal de la especie porcina que había sido vacunado contra la PPC con una vacuna contra VPPC que comprende una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado.

10 La invención se refiere a un método *in vitro* de diagnóstico de la infección con VPPC, comprendiendo el método el uso de un método de detección de acuerdo con la invención, o comprendiendo el uso de un kit de prueba de diagnóstico de acuerdo con la invención, y en el que la presencia de anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre se determina en relación con la puntuación de muestras de referencia positiva y negativa.

15 El método de detección de acuerdo con la invención, o el kit de ensayo de diagnóstico para la invención, se emplea para la erradicación de la enfermedad del VPPC, o en un programa nacional de vigilancia, como un diagnóstico complementario, junto con la vacunación con una vacuna contra el VPPC.

Con esta combinación, se puede aplicar un enfoque DAIV para VPPC, lo que permite diferenciar los animales infectados de los vacunados.

20 La invención se refiere a un método de control de una infección por VPPC de tipo silvestre en una población de animales de la especie porcina, mediante el uso combinado de una vacuna contra VPPC que comprende una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado, y un kit de prueba de diagnóstico para la invención.

25 Como la invención proporciona una fuerte reducción en las puntuaciones de falsos positivos, las muestras (suero) procedentes de animales vacunados pueden ahora ser identificadas de forma fiable como negativas para anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre. Solo los animales verdaderamente positivos necesitan ser señalados, y sometidos a medidas adecuadas de control y de cuarentena en el contexto de vigilancia - programas de erradicación o de sacrificio sanitario.

30 En consecuencia, este uso combinado de una vacuna contra VPPC y un método de diagnóstico permite la sustitución de una política de sacrificio sanitario indeseable y muy costosa con un programa de erradicación de VPPC a base de una vacuna estructurada, lo que reduce el sufrimiento animal y los costes económicos.

35 La "población de animales de la especie porcina" puede ser tomada como un grupo a nivel local (granja), a nivel regional, o incluso a nivel nacional. Los detalles y el protocolo para el "uso combinado" dependerán del protocolo de vacunación prescrito para la vacuna (marcadora) contra VPPC particular que se va a usar. Asimismo, el rendimiento del uso combinado dependerá de los requisitos y el motivo de la identificación sistemática, o incluso de las regulaciones gubernamentales específicas que pueden necesitar cumplirse.

40 Algunos ejemplos: en el caso de vacunación de rutina, los cerdos serán vacunados contra el VPPC una o dos veces a temprana edad, y reciben una vacuna de refuerzo, p. ej., a intervalos anuales. Estos animales pueden ser sometidos a ensayo siempre que se tenga la sospecha de infección por VPPC de tipo silvestre. Alternativamente: los cerdos destinados a la exportación que habían sido vacunados, se pueden someter a ensayo poco antes de su fecha de exportación prevista. También: en caso de sospecha de infección por VPPC o en situaciones de brote de VPPC, la vacunación y la prueba se pueden realizar en un corto intervalo de tiempo, de semanas, quizás incluso días. Estas y otras realizaciones concebibles por el experto, están dentro del alcance de la invención.

50 En la práctica, cuando una muestra tiene una puntuación positiva o negativa para anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre, se puede obtener la confirmación por medio de la reevaluación de una muestra de la misma diana, pero desde un punto diferente en el tiempo, o mediante pruebas de otros animales de la misma piara o área. Alternativamente, el resultado puede ser confirmado usando una técnica diferente, y un tipo diferente de la muestra, p. ej., mediante la detección del virus en sangre, tejido, escobillones nasales, o heces por ensayo de neutralización del virus, o por la detección de ácido nucleico viral. (p. ej., por PCR).

55 La invención se describirá ahora adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

### Ejemplos

60 **Ejemplo 1: Ensayo de muestras porcinas:**

#### 1.1. Muestras de ensayo:

65 Las muestras de ensayo usadas en el Ejemplo 1 se obtuvieron del Instituto Central Veterinario (Lelystad, Países Bajos), y se describen en Kortekaas *et al.*, 2011 (*supra*). En resumen: los cerdos seronegativos de 8 semanas de edad fueron vacunados con vacunas vivas contra VPPC: ya sea basándose en la cepa C o en el virus vFlc-ΔPTa1.

Se tomaron muestras de sangre a lo largo de varias semanas. Se preparó el suero para el ensayo. A los 28 días después de la vacunación, los animales fueron infectados por VPPC de tipo silvestre.

#### 1.2. Ensayo de ELISA del estado de la técnica:

5 Como se describe por Kortekaas *et al.*, 2011 (*supra*), los sueros porcinos obtenidos se ensayaron usando un ELISA comercial: PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 (Prionics). Esto se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en resumen: se usaron placas de microtitulación pre-recubiertas, y el tampón de muestra del kit se administró. Las  
10 muestras de control se añadieron a los pocillos específicos, y las muestras de ensayo (suero porcino) a otros pocillos. A continuación, las placas se incubaron, se lavaron, y el conjugado se administró. De nuevo, las placas se incubaron y se lavaron, y, finalmente, se añadió un reactivo colorante, se incubó y luego se detuvo. Las placas siguientes se leyeron mediante la medición de DO. Los porcentajes de inhibición de ELISA se calcularon basándose en el patrón positivo. Los resultados se representan en la Figura 1A, ya que los resultados comparativos, reprodujeron esencialmente la Figura 4A de Kortekaas *et al.*, 2011 (*supra*). Para este ELISA, el umbral de  
15 separación positiva/negativa es una inhibición del 40 %.

Como resulta evidente a partir de estos resultados: tanto las muestras de suero de cerdos vacunados contra la cepa C (líneas de puntos), así como las muestras de cerdos vacunados con la vacuna marcadora contra el virus vFic- $\Delta$ PTa1 (líneas continuas), responden de forma positiva con el tiempo; es decir, inducen el 40 % o más de inhibición.  
20 En consecuencia, no podría hacerse una clara distinción entre los animales que se vacunaron con la vacuna contra la cepa C o con la vacuna marcadora contra VPPC (es decir, virus vFic- $\Delta$ PTa1).

#### 1.3. Reevaluación de las muestras de la técnica anterior:

25 Estas muestras de suero de Kortekaas *et al.* 2011 (*supra*) fueron entonces reevaluadas usando un ELISA comercial diferente para los anticuerpos contra E2 del VPPC: IDEXX CSFV Ab Test® (IDEXX), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y con un protocolo que es esencialmente idéntico al ELISA de Prionics descrito anteriormente.

30 Los resultados se presentan en la Figura 1B, y la barra horizontal gris indica el umbral para la separación positiva/negativa en este ensayo, en el que: los negativos se encuentran en una inhibición del 30 % o menos; los positivos se encuentran en una inhibición del 40 % o más; las puntuaciones entre una inhibición del 30 y el 40 % son muestras sospechosas. Los resultados en los que el nivel de inhibición es un valor negativo, representan muestras con valores de DO mayores que las del control negativo. Estos pueden ser considerados como valores de % de  
35 inhibición cero.

Como resulta evidente a partir del gráfico, y similar a los resultados en ELISA de Prionics, casi todas las muestras reaccionan de forma positiva con el tiempo; solo una vacuna marcadora (cerdo n.º 3161) se mantuvo en un nivel completamente negativo. Dos muestras de cerdos, n.º 3163 y 3164, dieron un valor pico a los 42 o 49 días después  
40 de la vacunación, esto puede estar relacionado con una reacción a la exposición; las muestras no pudieron reevaluarse por falta de material.

#### 1.4. Proteínas E2

45 La proteína E2 fue producida para su uso en una co-incubación para el método de acuerdo con la invención, a partir del gen E2 del virus del VPPC de la cepa C y del virus vFic- $\Delta$ PTa1. Inicialmente, la secuencia de nucleótidos de sus genes E2 fue un codón optimizado para la expresión en el sistema de expresión de células de insectos y baculovirus, mientras se usan únicamente mutaciones silenciosas. A continuación, el ADN de acuerdo con la secuencia optimizada se sintetizó químicamente y se clonó en un plásmido pFastBac® (Life technologies), detrás del  
50 promotor de polihedrina. El casete de expresión se transfirió mediante transposición específica al sitio en un ADN bácmido recombinante y se amplificó en una bacteria competente de *Escherichia coli* DH10Bac. A continuación, el ADN bácmido se aisló, y se usó para transfectar células de insecto Sf9. El baculovirus recombinante obtenido a partir del sobrenadante de transfección se usó para infectar células de insecto Sf9 recientes. El baculovirus se aisló y se usó para infectar células de insecto Sf21 cultivadas en biorreactores de 2 l. Ambas proteínas E2 se expresaron  
55 en estos cultivos de biorreactor, principalmente en el sobrenadante. Estas se recogieron, y la proteína E2 se aisló por cromatografía en columna de afinidad, en una columna de sefarosa que se había acoplado con un anticuerpo monoclonal específico del epítipo TAVSPTTLR. La proteína E2 purificada se recogió de la columna, y se cuantificó mediante un ELISA por inhibición.

60 Usando electroforesis en gel de SDS, se caracterizó la proteína E2 expresada y purificada: se observó una única banda de aproximadamente 80 kDa, con una pureza de aproximadamente el 80 %. A continuación, la E2 se cuantificó en un ELISA, junto a la ponderación de las muestras convencionales. La proteína E2 del VPPC expresada recombinante con un epítipo TAVSPTTLR mutado habitualmente se pudo obtener como una solución madre purificada de aproximadamente 800  $\mu$ g/ml.  
65

1.5. Detección por el método de acuerdo con la invención:

El método de detección de anticuerpos contra VPPC de tipo silvestre en una muestra de ensayo de acuerdo con la invención se aplicó sobre las muestras de Kortekaas *et al.*, 2011 (*supra*) descritas anteriormente.

El protocolo se basó en gran medida en ELISA IDEXX, con además la co-incubación. En resumen: el kit de IDEXX CSF Ab Test se empleó de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con una excepción: el diluyente de la muestra convencional del kit fue reemplazado con una versión concentrada 2x. Acto seguido, 25 µl (que es la mitad del volumen prescrito en el protocolo del kit de prueba) de este diluyente de muestra 2x se co-incubó en los pocillos recubiertos con E2 con 50 µl de muestra de suero y 25 µl de una solución de proteína E2 del VPPC expresada con Baculovirus con epítipo TAVSPTTLR mutado, de modo que aproximadamente 1 µg de E2/pocillo estaba presente.

La proteína E2 del VPPC con epítipo TAVSPTTLR mutado que se usó en estas co-incubaciones fue la E2 que está comprendida en el virus de la vacuna vFlc-ΔPTa1.

Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 1C, e ilustran inmediatamente la diferencia con los resultados del mismo ensayo sin co-incubación (Figura 1B); o con un ensayo similar, sin co-incubación (Figura 1A). Todas las muestras de cerdos vacunados contra la cepa C reaccionan de forma positiva, mientras que todas las muestras de los cerdos vacunados con marcadores reaccionan de forma negativa. No se encontró efecto alguno de la vacunación de refuerzo, e incluso los valores pico observados para los cerdos n.º 3163 y 3164 estaban por debajo del umbral. De este modo, una prueba DAIV eficaz es finalmente posible para una vacuna viva atenuada contra VPPC.

Cuando este experimento se repitió usando la proteína E2 del VPPC de tipo silvestre para la co-incubación (no presentado en este caso), los resultados fueron totalmente diferentes: todas las muestras se calificaron como negativas, incluso las muestras de cerdos vacunados con la cepa C. En consecuencia, esto no es una alternativa útil.

La introducción de la co-incubación también se hizo en el protocolo básico de ELISA PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 (Prionics). Esencialmente se observaron los mismos resultados: una reducción muy eficaz de resultados falsos positivos, dejando solo las muestras verdaderas positivas que puntúan de forma positiva (en este caso: por encima del 40 % de inhibición de ELISA).

1.6. Resumen de los resultados a partir de la reevaluación de las muestras de la técnica anterior:

Los resultados de los experimentos descritos anteriormente se ensamblan en la Tabla 1. Esto revela que la clasificación de los animales vacunados que reciben el experimento de Kortekaas 2011 (*supra*), difiere cuando se sometieron a ensayo por ser positivos/sospechosos para anticuerpos VPPC, en función del método de detección de anticuerpos E2 que se aplique. Como es evidente, solamente mediante el uso de co-incubación con un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, los animales vacunados con una vacuna contra VPPC que comprende una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado, puede distinguirse claramente de los animales que habían sido infectados por VPPC de tipo silvestre - o vacunados contra la cepa C.

Tabla 1: Número de animales del experimento de Kortekaas 2011, puntuación sospechosa o positiva para los anticuerpos contra VPPC usando diferentes métodos de detección de anticuerpos contra E2 del VPPC.

Método de detección de anticuerpos E2 del VPPC	Vacunados contra tipo silvestre	Vacunados con marcador
ELISA Prionics	4/4	5/5
ELISA IDEXX	4/4	4/5
ELISA IDEXX + co-incubación con E2 de tipo silvestre	0/4	0/5
ELISA IDEXX + co-incubación con E2 mutada	4/4	0/5

**Ejemplo 2: Establecimiento de la especificidad y sensibilidad de la prueba.**

Para determinar que la especificidad y la sensibilidad de los métodos de acuerdo con la invención es al menos comparable a la de un anticuerpo comercial estándar E2 del VPPC por ELISA, un gran número de muestras (aproximadamente 900) se ensayaron usando uno de los métodos de acuerdo con la invención. Las muestras fueron disponibles por el Dr. W.L. Loeffen, de la colección de la División de Virología, Instituto Central de Veterinaria, Lelystad, Países Bajos, e incluyeron un grupo de más de 400 sueros de cerdo de campo negativo a VPPC procedentes de los Países Bajos, un grupo de más de 400 muestras de cerdos infectados experimentalmente por VPPC que fueron muestreadas durante varias semanas, y un grupo de aproximadamente 80 muestras de suero de cerdos de origen mixto; este último grupo contenía sueros positivos y negativos, de los cerdos vacunados contra o

infectados por VPPC, así como cerdos infectados por cepas VEF o VDVB, así como algunas infecciones mezcladas.

5 Para la aplicación de los métodos de acuerdo con la invención, todas las muestras se ensayaron usando el protocolo y los materiales del kit IDEXX CSF Ab Test, usando las placas pre-recubiertas, las muestras de control positivas y negativas, el conjugado de anticuerpo monoclonal A18, el sustrato de reacción al color, la solución de interrupción, y la solución de lavado. Solo la desviación fue que el diluyente de la muestra fue reemplazado por una versión 2x concentrada de ese diluyente, que se usó en la mitad del volumen de acuerdo con el protocolo de prueba; la otra mitad del volumen fue proporcionada por la adición de una solución que comprende la proteína E2 del VPPC con un epítipo TAVSPTTLR mutado, a saber, la proteína E2 comprendida en el virus vFlc-ΔPTa1. Las muestras de control se ensayaron por duplicado, las muestras de ensayo una vez.

10 La interpretación de los resultados de inhibición de ELISA fue la misma que para el ELISA comercial: los negativos se encuentran en una inhibición del 30 % o menos; los positivos se encuentran en el 40 % o más de inhibición; las puntuaciones entre una inhibición del 30 y el 40 % son muestras sospechosas.

15 2.1. Muestras de campo negativo a VPPC:

20 El grupo de sueros de campo negativo generalmente puntuó entre -20 y 0 % de inhibición de ELISA. Los resultados se representan en la Figura 2. La puntuación media de las 413 muestras fue: -11 % ± 5,2 %. Esto estaba en línea con las expectativas: todas las muestras se calificaron muy por debajo del valor de umbral para sospechosos/positivos (30 % de inhibición de ELISA), y el uso del método de detección, y el método de diferenciación, de acuerdo con la invención no produjeron puntuaciones de falsos positivos de muestras verdaderas negativas.

25 2.2. Muestras experimentales positivas a VPPC:

30 El análisis de un grupo de más de 400 muestras positivas a VPPC tomadas con el tiempo, demostró que la sensibilidad de los métodos de acuerdo con la invención es excelente. Los resultados se presentan en la Figura 3, y demuestran que, sobre todo en los primeros tiempos después de la infección, los métodos de acuerdo con la invención proporcionan resultados que permiten que más muestras sean clasificadas como positivas y menos muestras sean clasificadas como sospechosas o negativas que un anticuerpo comercial contra E2 del VPPC por ELISA. Esto es más evidente a los 14 días después de la infección, y todavía un poco a los 21 días después de la infección.

35 Por consiguiente, esto demuestra que la sensibilidad de los métodos de acuerdo con la invención, en la detección correctamente de verdaderos positivos, es al menos tan buena como la de un anticuerpo comercial contra E2 del VPPC por ELISA, o dicho de otro modo; por el contrario, la introducción de la co-incubación en una etapa de un anticuerpo contra E2 del VPPC existente por ELISA no dañó la sensibilidad de la prueba.

40 2.3. Muestras mixtas:

45 Un grupo de aproximadamente 80 muestras de diversos tipos se ensayó usando los métodos de acuerdo con la invención, para comparar los resultados con los de un ELISA comercial convencional. Las diversas muestras eran de paneles conocidos como "taller Erns", "panel de referencia UE del VPPC", y el "panel de referencia de *Pestivirus*" interno de ICV de Lelystad.

50 Las muestras y sus códigos se enumeran en la Tabla 2, junto con los resultados de la detección de anticuerpos contra E2 del VPPC, usando cualquiera de los métodos de acuerdo con la invención (indicado en la columna "invención"), o usando un anticuerpo comercial E2 del VPPC por ELISA (indicado en la columna "comercial"). La columna con números de muestra es solamente para fines de referencia: las muestras 1-54 son sueros de muestras de campo de los animales infectados por diferentes cepas de VPPC, o vacunados contra el VPPC; se tomaron muestras en diferentes días después de la infección (dpi) o días después de la vacunación (dpv); las muestras 55-60 son verdaderos negativos; las muestras n.º 61-67 son sueros de infecciones por VDVB; la muestra 68 de la infección por VEF; y las muestras 69-76 de infecciones mixtas.

55 Los resultados se presentan como un porcentaje de puntuación de inhibición de ELISA, y se clasifican de acuerdo al programa de puntuación de ELISA comercial.

60 Como se desprende de los resultados de la Tabla 2, para la gran mayoría de las muestras ensayadas, los resultados obtenidos usando los métodos de acuerdo con la invención produjeron calificaciones de porcentaje de inhibición de ELISA con más distinción que el ELISA comercial. En solo dos casos los resultados usando el método de acuerdo con la invención se desviaron de una manera negativa, en comparación con el ELISA comercial: las muestras 23 y 75. No se sabe si estos eran errores en el rendimiento de prueba. En consecuencia, los métodos de acuerdo con la invención son al menos tan sensibles como un ELISA comercial para anticuerpos contra E2 del VPPC.

65 Esto puede tener consecuencias significativas, ya que para varias muestras, el ELISA comercial y los métodos de

## ES 2 668 459 T3

acuerdo con la invención dieron lugar a diferentes clasificaciones. Los ejemplos son: las muestras n.º: 8, 25, 28, 38, y 45, que fueron clasificadas como "sospechosas" por ELISA comercial, pero de acuerdo con los métodos de la invención tendrían que ser clasificadas como "positivas" para anticuerpos contra E2 del VPPC. Del mismo modo, la muestra n.º 37 necesitaría un cambio en la clasificación de negativa a sospechosa.

5 Para solo dos muestras, n.º 23 y 75, el resultado del método de acuerdo con la invención fue negativo, mientras que la puntuación para el anticuerpo contra E2 por ELISA comercial fue positiva. Un error experimental, en cualquiera de los ensayos, puede ser una causa.

10 Tabla 2: Resultados de la detección de anticuerpos contra E2 del VPPC en un conjunto de muestras mezcladas, expresados por porcentaje de inhibición de ELISA.

N.º	Origen/tipo de muestra de suero	Inventión	Comercial		N.º	Origen/tipo de muestra de suero	Inventión	Comercial
1	pr 83-01/ Denissen 49 dpi/ VPPC	105	94		39	PPC D29	95	76
2	pr 86-01/ Alfort 120 dpi/ VPPC	105	94		40	PPC D18	75	56
3	pr 96-16/ cedipest 28 dpi/ VPPC	69	48		41	PPC D20	77	61
4	pr 96-16/ cedipest 28 dpi/ VPPC	81	51		42	PPC0123, 14 dpi	45	41
5	pr 96-16/ cedipest 28 dpi/ VPPC	61	53		43	PPC0277, 17 dpi	86	69
6	pr. 96-04/ v. Zoelen 46 dpi/ VPPC	96	77		44	PPC0650,20 dpi	76	52
7	pr 95-05/ E2- vac. 35 dpi/ VPPC	95	84		45	PPC0902, 21 dpi	49	34
8	pr 95-05/ E2- vac. 35 dpi/ VPPC	48	31		46	PPC0123, 20 dpi	73	53
9	pr 95-05/ E2- vacc. 35 dpi/ VPPC	76	56		47	PPC0277, 25 dpi	79	62
10	pr 96-05/ Bergen 28 dpi/ VPPC	89	72		48	PPC0902, 26 dpi	85	62
11	pr 96-05/ Bergen 28 dpi/ VPPC	77	56		49	PPC0573, 26 dpi	74	56
12	pr 96-05/ Bergen 35 dpi/ VPPC	76	61		50	PPC0104, 29 dpi	89	69
13	pr 96-04 v. Zoelen 27 dpi/ VPPC	76	52		51	PPC0695, 33 dpi	81	71
14	pr 96-04 v. Zoelen 27 dpi/ VPPC	89	68		52	PPC0573, 33 dpi	85	69
15	pr 96-04 v. Zoelen 27 dpi /VPPC	76	48		53	PPC0123, 43 dpi	95	84
16	pr 96-06/ Henken 28 dpi /VPPC	77	50		54	PPC0104, 77 dpi	94	87
17	pr 96-06/ Henken 28 dpi	78	53		55	pr 90-07/te Breteler/ VDVB	8	-7

ES 2 668 459 T3

	/VPPC							
18	pr 96-06/ Henken 28 dpi /VPPC	82	56		56	pr. 83-04/ Borgers/ VDVB	6	24
19	pr 96-06/ Henken 28 dpi /VPPC	86	62		57	pr. 83-04/ Borgers/ VDVB	2	-13
20	pr 98-04/ Cedipest 49 dpv/ VPPC	74	59		58	pr. 83-04 den Otter/VDVB	12	0
21	pr 98-04/ Cedipest 49 dpv/ VPPC	88	71		59	pr 83-04/ Kossink/ VDVB	1	-5
22	pr 98-04/ Cedipest 49 dpv/ VPPC	96	83		60	pr 83-04 Poels/ VDVB	20	29
23	pr 98-04/ Cedipest 49 dpv/ VPPC	7	48		61	VEF D69	0	18
24	pr 98-04/ Cedipest 49 dpv/ VPPC	82	64		62	VEF D34	15	-6
25	pr 98-08/ aislado 97-01 (Melis) 14 dpi/VPPC	52	38		63	VEF D69	1	2
26	pr 98-08/aislado 97-01 (Melis) 18 dpi/VPPC	74	63		64	VEF 10421/96, 34 dpi	-11	0
27	pr 98-08/aislado 97-01 (Melis) 15 dpi/VPPC	23	10		65	VEF NADL/Osloss, 179 dpi	3	2
28	pr 98-08/aislado 97-01 (Melis) 18 dpi/VPPC	51	37		66	VEF Arnsberg, 69 dpi	-8	-2
29	pr 98-08/aislado 97-01 (Melis) 14 dpi/VPPC	6	16		67	VEF II Giessen, 64 dpi	-5	-7
30	pr 98-08/aislado 97-01 (Melis) 18 dpi/aislado	12	4		68	BD"F	-9	1
31	pr 98-08/aislado 97-01 (Melis) 18 dpi/VPPC	72	47		69	pr 94-13/ cepa "F"/VEF	9	-1
32	pr 98-08/aislado 97-01 (Melis) 18 dpi/VPPC	79	55		70	pr 94-13/ cepa "F"/VEF	58	45
33	PPC D33	79	67		71	pr 94-13/ cepa "F"/VEF	85	75
34	PPC D14	36	24		72	pr 97-17/ veld VPPC-VDVB	3	15
35	PPC D21	41	27		73	pr 97-17/veld VPPC-VDVB	12	29
36	PPC D26	87	61		74	pr 97-17/veld VPPC-VDVB/ VPPC 28 dpi	83	73
37	PPC D15	39	25		75	pr 97-17/veld VPPC-VDVB/ VPPC 28 dpi	14	41
38	PPC D21	58	38		76	BD+PPC D20	80	56

**Leyenda de las figuras**

- 5  
10  
15  
20  
25  
30  
35
- Figura 1: Resultados de los análisis por ELISA de bloqueo para anticuerpos contra E2 del VPPC en muestras descritas por Kortekaas *et al.*, 2011 (*supra*): se comparan los análisis de ensayos comerciales convencionales, y el análisis por el método de acuerdo con la invención.  
Las líneas discontinuas representan los resultados de las muestras de cerdos vacunados con la vacuna contra VPPC de la cepa C, las muestras "CS"; las líneas continuas representan los resultados de las muestras de cerdos vacunados con la vacuna marcadora basada en el virus vF1c-ΔPTa1, las muestras "VS".  
Las barras grises horizontales indican las puntuaciones de umbral en los diferentes ensayos para la interpretación de las muestras como positivas, sospechosas, o negativas para anticuerpos contra E2 del VPPC de tipo silvestre.
- Figura 1 A: Resultados comparativos: reproducción de la Figura 4A de Kortekaas *et al.*, 2011 (*supra*). El ELISA para E2 usado fue PrioCHECK® CSFV Ab 2.0 (Prionics).
- Figura 1 B: Resultados de reevaluación de muestras de Kortekaas *et al.*, 2011 (*supra*), usando un ELISA para E2 comercial diferente, IDEXX CSFV Ab Test® (IDEXX).
- Figura 1 C: Resultados de reevaluación de muestras de Kortekaas *et al.*, 2011 (*supra*) usando el método de detección de acuerdo con la invención: se introdujo una co-incubación en una etapa del IDEXX CSFV Ab Test.
- Figura 2: Resultados de los análisis del anticuerpo contra VPPC en más de 400 muestras de campo negativas. La prueba se realizó de acuerdo con el protocolo para IDEXX CSFV Ab Test® (IDEXX), como una modificación a la co-incubación en un método de acuerdo con la invención. Los resultados se indican como las medias del porcentaje de inhibición de ELISA detectado por placa de microtitulación, con un resultado para todas las muestras combinadas, y uno para todas las placas combinadas. Los valores más altos y más bajos se indican con diamantes negros, conectados por barras negras, y las medias por un diamante gris.
- Figura 3: Resultados del análisis de más de 400 muestras de cerdos infectados experimentalmente por VPPC, y muestreadas a las 2, 3, o 4 semanas después de la inoculación. No de todos los animales se obtuvieron tres muestras disponibles. El método de detección fue el método de acuerdo con la invención, indicado como "Inv."; o fue un ELISA comercial (IDEXX CSFV Ab Test), indicado como "Com.". Las clasificaciones: negativo, sospechoso, y positivo se basaron en el porcentaje de inhibición de ELISA medido, y asignado de acuerdo con el programa de puntuación de ELISA comercial, respectivamente, como una inhibición de ELISA de menos de 30 %, 30-40 %, o más de 40 %.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

- 40 <110> Intervet International BV
- <120> Prueba de diagnostico mejorado para anticuerpos del VPPC
- 45 <130> 23678
- <160> 3
- <170> PatentIn versión 3.5
- 50 <210> 1  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Virus de la peste porcina clásica
- 55 <400> 1
- Thr Ala Val Ser Pro Thr Thr Leu Arg**  
**1 5**
- 60 <210> 2  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- <220>



## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un método de detección de anticuerpos contra el virus de la peste porcina clásica (VPPC) de tipo silvestre en una muestra de ensayo, en el que dicha muestra también puede comprender anticuerpos contra un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, comprendiendo el método una etapa que consiste en incubar dicha muestra de ensayo con un vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC, **caracterizado por que** el método comprende la co-incubación en dicha etapa con un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la detección se lleva a cabo por ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas).
- 15 3. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en el que la muestra de ensayo se obtiene a partir de un animal porcino que ha sido vacunado contra la PPC con una vacuna contra el VPPC que comprende una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado.
- 20 4. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC que está comprendido en el vehículo para su uso en la co-incubación es idéntico al epítipo TAVSPTTLR mutado comprendido en la proteína E2 del VPPC de una vacuna contra el VPPC que se usó para vacunar a los animales porcinos a partir de los cuales se obtuvo la muestra de ensayo.
- 25 5. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC que está comprendido en el vehículo para su uso en la co-incubación tiene la secuencia de aminoácidos: TAGSTLRTE (SEQ ID NO: 2).
- 30 6. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 4 o 5, en el que la vacuna contra el VPPC se basó en el virus vFic-ΔPTa1.
- 35 7. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que el vehículo inmovilizado que comprende un epítipo TAVSPTTLR de E2 del VPPC o el vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC es una proteína E2 del VPPC, o en el que los vehículos son proteínas E2 del VPPC.
8. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende la adaptación de las condiciones de incubación de la etapa que comprende la co-incubación con un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC, para adaptarse a la adición de dicho vehículo.
- 40 9. Uso de un vehículo que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado de E2 del VPPC para la co-incubación en un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
10. Un método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en donde el método se aplica para diferenciar los animales infectados por el VPPC de tipo silvestre de los animales que fueron vacunados contra el VPPC con una vacuna contra el VPPC, con lo cual la vacuna comprende una proteína E2 del VPPC que comprende un epítipo TAVSPTTLR mutado.

Fig 1 A:

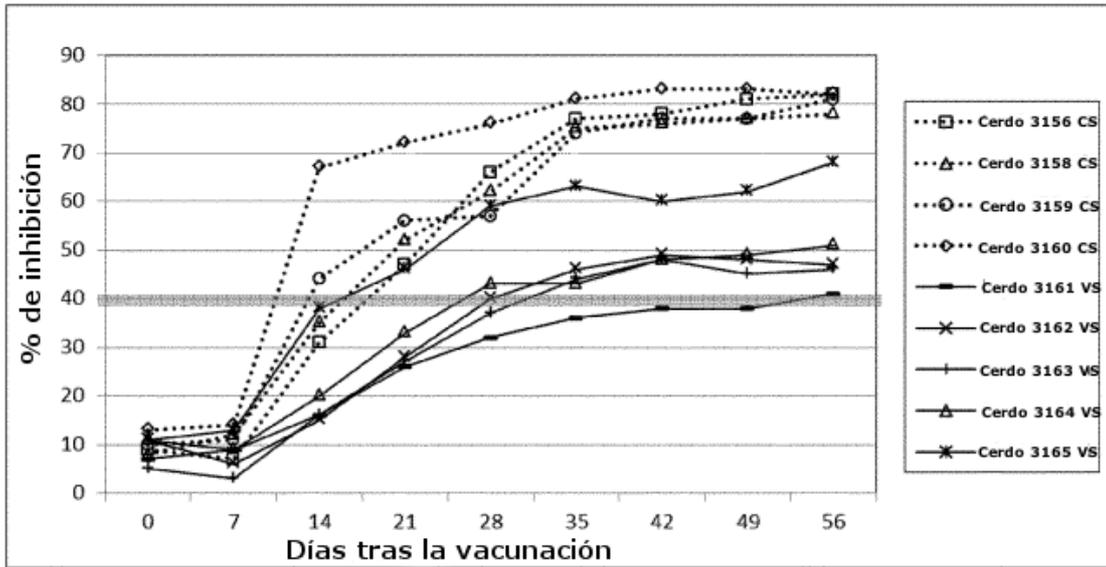


Fig 1 B:

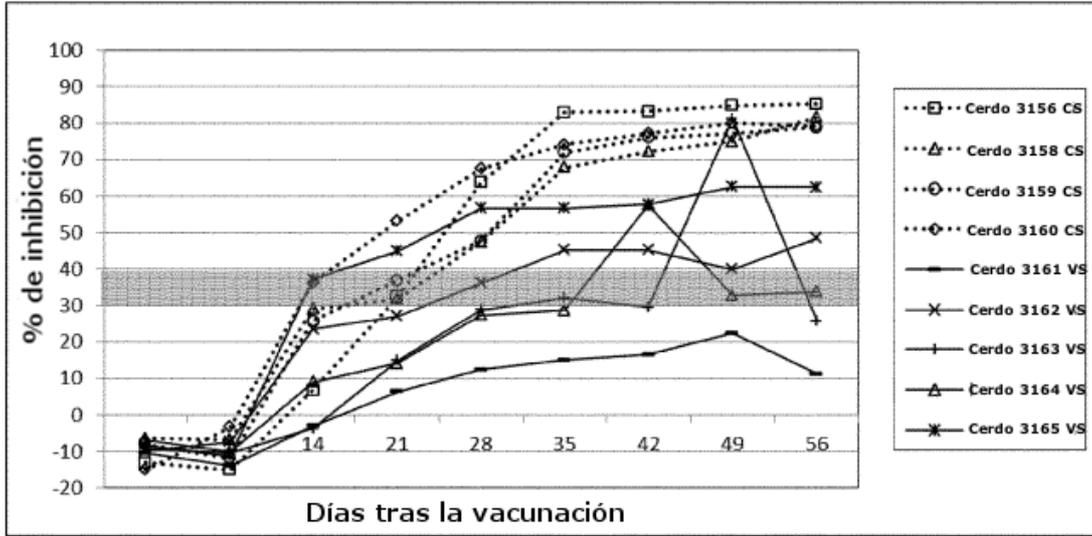


Fig 1 C

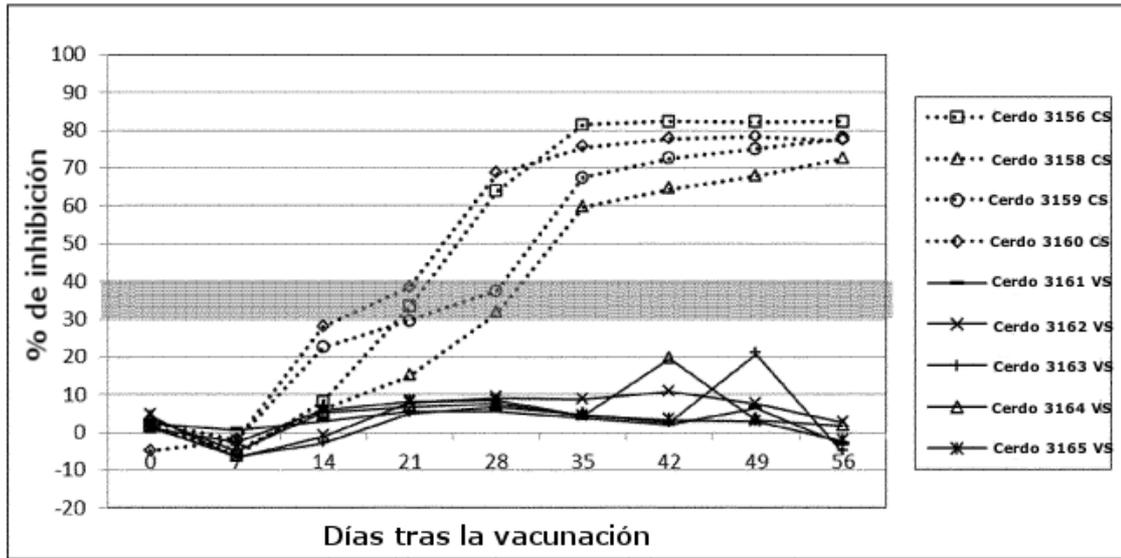


Figura 2

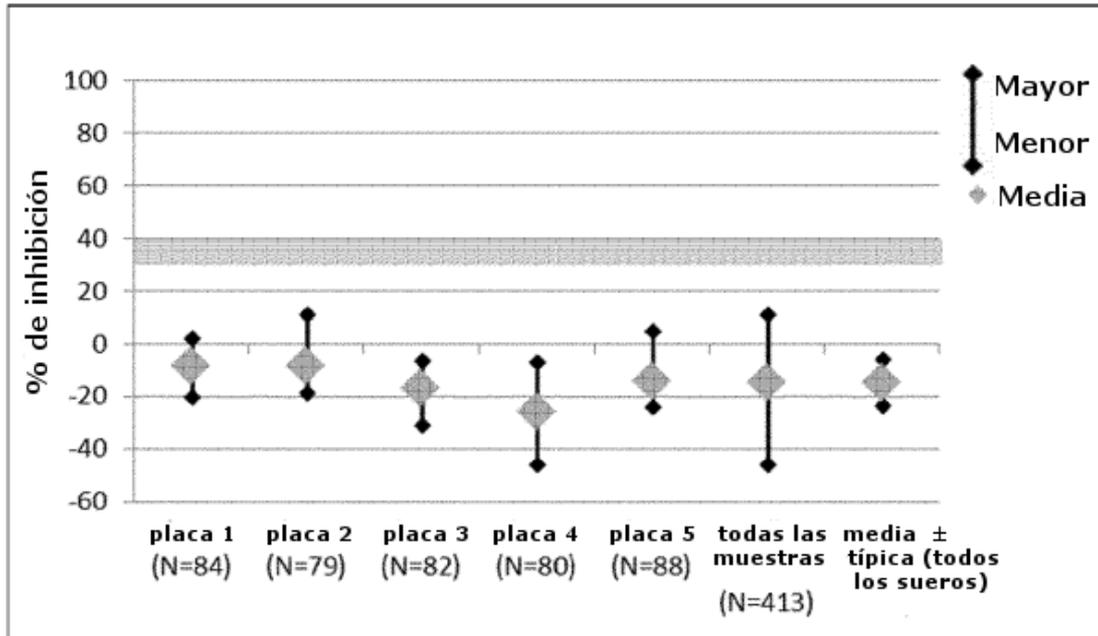


Figura 3

