

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 837 133**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.07.2016** **PCT/US2016/043129**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.02.2017** **WO17019404**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.07.2016** **E 16745594 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.09.2020** **EP 3325970**

54 Título: **Procedimiento de cuantificación de virus de alto rendimiento**

30 Prioridad:

24.07.2015 US 201562196886 P

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

29.06.2021

73 Titular/es:

**BOEHRINGER INGELHEIM ANIMAL HEALTH USA
INC. (100.0%)
3239 Satellite Boulevard, Bldg. 500
Duluth, GA 30096 , US**

72 Inventor/es:

REYES, JEAN

74 Agente/Representante:

PONTI & PARTNERS, S.L.P.

ES 2 837 133 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

Procedimiento de cuantificación de virus de alto rendimiento

5 **REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS**

[0001] Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos 62/196.886, presentada el 24 de julio de 2015.

10 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0002] La presente invención se refiere a procedimientos de determinación de un título viral de alto rendimiento. La presente invención aborda la necesidad de un procedimiento más rápido y rentable de cuantificar partículas virales infecciosas en una muestra.

15 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

[0003] Un reto particular en el suministro de un gen mediante un vector viral o un virus con fines terapéuticos es la preparación y la cuantificación exacta de formas de dosificación clínicas. La producción de vacunas virales, proteínas recombinantes utilizando vectores virales y antígenos virales requieren la cuantificación de virus para adaptar y controlar continuamente el proceso con el fin de optimizar los rendimientos de producción y responder a las demandas y aplicaciones en constante cambio.

[0004] La determinación del título de virus o la cuantificación del virus implican contar el número de virus en un volumen específico para determinar la concentración del virus. Los procedimientos tradicionales incluyen ensayos de placa viral que determinan el número de unidades formadoras de placa (ufp) en una muestra de virus y la dosis infecciosa de cultivo de tejido (TCID₅₀) o la dosis infecciosa activa de fluorescencia (FAID50) que mide el título de virus infeccioso. Este ensayo de TCID₅₀ cuantifica la cantidad de virus necesaria para matar el 50% de los huéspedes infectados o para producir un efecto citopático en el 50% de las células de cultivo de tejidos inoculadas. Los procedimientos tradicionales son generalmente lentos y laboriosos, y adolecen de limitaciones que incluyen un alto grado de variabilidad entre ensayos.

[0005] El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) es una variación más moderna de un ensayo de proteínas que utiliza un anticuerpo específico unido a una enzima para detectar la presencia de una cantidad desconocida de antígeno (es decir, virus) en una muestra. El evento de unión anticuerpo-antígeno se detecta y/o cuantifica a través de la capacidad de la enzima para convertir un reactivo en una señal detectable que se puede usar para calcular la concentración del antígeno en la muestra. Se desarrollan los ensayos en placa de la determinación del título de virus que se basan en la detección por inmunofluorescencia mediante ELISA, sin embargo se utilizan para cuantificar proteínas de muestras de virus y no para cuantificar virus infecciosos.

[0006] Se han utilizado ensayos de citometría de flujo o FACS (clasificador de células activado por fluorescencia) para medir el número de células infectadas en cultivos de células infectadas con multiplicidades de infección relativamente altas. Por ejemplo, el documento US 6.248.514 describe el uso de citometría de flujo para analizar células infectadas usando rangos específicos de concentración de partículas víricas y rendimientos de tiempo de adsorción. El documento US 7.476.507 describe procedimientos basados en FACS para la determinación del título viral de un cultivo de células huésped de animales huéspedes infectadas con un circovirus. Sin embargo, para muchas aplicaciones, el coste, el tamaño y la complejidad de los instrumentos de citometría de flujo impiden un uso más amplio. La solicitud internacional WO98/01582 describe un procedimiento de cuantificación de virus, pero no se describe un único instrumento de sobremesa que combine las funciones de un microscopio digital, un citómetro de imagen y un contador celular.

[0007] ERIKA HAMMARLUND ET AL: "A Flow Citometry-Based Assay for Quantifying Non-Plaque Forming Strains of Yellow Fever Virus", PLOS ONE, vol. 7, no. 9, 19 de septiembre de 2012, página e41707, describe un ensayo de formación de focos para determinar un título viral.

[0008] Recientemente, se han desarrollado citómetros de imagen personales que combinan las funciones de un microscopio digital, un citómetro de imagen y un contador de células en un único instrumento de sobremesa. Los citómetros de imagen disponibles comercialmente incluyen CellInsight (ThermoFisher) y Cytell Cell Imaging System (GE Healthcare). Estos citómetros de imagen se utilizan para realizar mediciones de células individuales, subcelulares y multicelulares, y brindan a los científicos la oportunidad de capturar datos de imágenes celulares y subcelulares y analizar los resultados con facilidad.

[0009] La presente invención aborda la necesidad de un procedimiento de cuantificación preciso y de alto rendimiento de partículas virales infecciosas en una muestra.

65 **CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION**

[0010] En un aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de cuantificación de virus que comprende las etapas de: proporcionar una muestra que contiene un virus; preparar diluciones en serie de la muestra; infectar células huésped con el virus e incubar el cultivo; hacer reaccionar un antígeno expresado por el virus en células infectadas con un anticuerpo marcado con una etiqueta fluorescente; determinar el número de células infectadas mediante el uso de un citómetro de imagen en el que el citómetro de imagen es un componente de un único instrumento de sobremesa que combina las funciones de un microscopio digital, dicho citómetro de imagen y un contador de células, preferiblemente en el que dicho citómetro de imagen es capaz de realizar mediciones de células individuales, subcelulares y multicelulares y de capturar datos de imágenes celulares y subcelulares; y determinar el título de virus en la muestra, en el que se traza una línea recta utilizando una regresión lineal entre el número de células marcadas con fluorescencia y el título de virus utilizando un virus de referencia.

[0011] En el presente documento se describen procedimientos de alto rendimiento para la determinación y cuantificación rápidas del virus infeccioso producido en una muestra. En el presente documento se describen procedimientos de alto rendimiento para la determinación y cuantificación rápidas del virus infeccioso producido en un cultivo discontinuo, de manera que se pueda obtener un punto de recogida óptimo. Los procedimientos comprenden proporcionar una muestra que contiene un virus, preparar diluciones en serie de la muestra, infectar las células huésped con el mismo e incubar el cultivo a una temperatura adecuada, hacer reaccionar un antígeno expresado por el virus en las células infectadas con un anticuerpo marcado con una etiqueta fluorescente, determinar el número de células marcadas con fluorescencia, determinando así el título de virus en la muestra. Los procedimientos de alto rendimiento se pueden llevar a cabo en un formato de placa de múltiples pocillos. En una realización, se utiliza CellInsight (ThermoFisher).

[0012] En un aspecto de la realización, se traza una línea recta utilizando una regresión lineal entre el número de células de fluorescencia y el título de virus utilizando un virus de referencia.

[0013] En otro aspecto de la realización, al menos una de las diluciones en serie de la muestra se encuentra dentro del rango de la línea de regresión lineal.

[0014] En aún otro aspecto de la realización, se utilizan placas de múltiples pocillos.

[0015] En aún otro aspecto de la realización, el número de células infectadas en cada pocillo se determina mediante un citómetro de imagen, tal como CellInsight.

[0016] El virus puede ser el virus de tipo salvaje, virus atenuados o virus recombinantes. Cuando el virus es un virus recombinante, el antígeno puede estar codificado por un gen exógeno. Normalmente, el antígeno reacciona con al menos un anticuerpo, aunque el anticuerpo puede ser una mezcla de anticuerpos. El anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal.

[0017] La muestra puede ser una muestra recogida de campos, muestra de un proceso de optimización, muestra de siembra, muestra de cultivo principal, principio activo o el producto final.

[0018] Estas y otras realizaciones se describen o son evidentes a partir de y están abarcadas por la siguiente descripción detallada.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0019] La siguiente descripción detallada se comprenderá mejor conjuntamente con los dibujos que se acompañan, incorporados aquí por referencia, en los que:

La figura 1 ilustra una muestra de diluciones.

La Figura 2 ilustra una muestra de diseño de placa en un ensayo de placa convencional.

La Figura 3 ilustra una muestra de diseño de placa en titulación de virus de alto rendimiento.

La Figura 4 ilustra una muestra de diseño de placa en titulación de virus de alto rendimiento.

La Figura 5 muestra la regresión lineal de CPV2.

La Figura 6 representa la comparación entre el procedimiento de título de virus convencional y el procedimiento de título de virus de alto rendimiento para CPV2.

La Figura 7 representa la regresión lineal del virus de la viruela (ALVAC aviar) que expresa un antígeno de gripe equina.

La Figura 8 representa la comparación entre el procedimiento de título de virus convencional y el procedimiento de título de virus de alto rendimiento para el virus de la viruela (ALVAC aviar) que expresa un antígeno de gripe equina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

[0020] Cabe indicar que en esta descripción y particularmente en las reivindicaciones, términos, tales como "comprende", "comprendido", "que comprende", pueden tener el significado que se le atribuye en la ley de Patentes de Estados Unidos; por ejemplo, pueden significar "incluye", "incluido", "que incluye" y términos, tales como "que

consiste esencialmente en y "consiste esencialmente en" tienen el significado que se les atribuye en la ley de patentes de los Estados Unidos, por ejemplo, permiten elementos que no se mencionan explícitamente, pero excluye elementos que se encuentren en el estado de la técnica o que afectan a una característica básica o novedosa de la invención.

5 [0021] Los términos singulares "un", "una" y "el/la" incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. De manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La palabra "o" significa cualquier miembro de una lista en particular y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista.

10 [0022] El término "citómetro de imagen" o "sistema de imágenes Cell", tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier dispositivo que irradiará una partícula suspendida en un medio fluido con luz a una longitud de onda, y es capaz de detectar una luz en la misma longitud de onda o una longitud de onda diferente, donde la luz detectada indica la presencia de una célula o un indicador en la misma, y toma imágenes del número de células usando microscopía óptica. El indicador en la superficie celular puede ser un anticuerpo acoplado a un fluoróforo, tal como
15 FITC, tinción de Hoechst, DAPI, GFP, TRITC y Cy5. El "citómetro de obtención de imágenes" o el "citómetro de imagen" puede acoplarse a un sistema de visualización de datos, almacenamiento de datos y gestión de datos para análisis en tiempo real.

20 [0023] El término "célula huésped", tal como se usa en el presente documento se refiere a una célula aislada que es un huésped para la infección y replicación de un virus. Una "célula huésped" indica una célula procariota o eucariota. La "célula huésped" puede estar alterada genéticamente, o es capaz de ser alterada genéticamente mediante la administración de un polinucleótido exógeno, tal como un plásmido o vector recombinante. La "célula huésped" puede ser una célula establecida en un linaje estable sin ninguna modificación genética, solo mediante
25 pases de cultivo repetidos. La "célula huésped" pueden ser células primarias que no están modificadas ni son estables. Cuando se hace referencia a células genéticamente alteradas, el término se refiere tanto a la célula originalmente alterada como a la progenie de la misma.

[0024] El término "en proceso" se refiere al control de los parámetros que son característicos de cultivo de células y virus, incluyendo un cultivo de células infectadas por virus, durante todo el período del cultivo.

30 [0025] El control puede ser continuo, tal como el control del pH o el contenido de oxígeno del medio de cultivo, o puede ser un control periódico en el que las muestras se extraen del cultivo en los puntos de tiempo seleccionados, se detectan y se miden parámetros, tales como la viabilidad o contenido de antígeno viral, y los parámetros se representan frente al tiempo del cultivo.

35 [0026] El término "cultivo de siembra" o "siembra", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un cultivo de células huésped infectadas con un virus seleccionado y que se incuba a continuación durante un período para permitir que aumente el título de virus. Típicamente, pero no necesariamente, el volumen de un cultivo de siembra es menor que el volumen del medio de fermentación o cultivo principal posterior que recibe el cultivo de siembra.

40 [0027] El término "animal" se utiliza en el presente documento para incluir todos los mamíferos, aves y peces. El animal, tal como se usa en este documento puede seleccionarse del grupo que consiste en animal equino (por ejemplo, caballo), canino (por ejemplo, perros, lobos, zorros, coyotes, chacales), felino (por ejemplo, leones, tigres, gatos domésticos, gatos salvajes, otros gatos grandes y otros felinos, incluidos guepardos y linces), bovinos (por ejemplo, vacas, búfalos), porcinos (por ejemplo, cerdo), ovinos (por ejemplo, ovejas), caprinos (por ejemplo, cabras), camélidos (por ejemplo, lamas), aves (por ejemplo, pollo, pato, ganso, pavo, codorniz, faisán, loro, pinzones, halcón, cuervo, avestruz, emú y casuario), primates (por ejemplo, prosimio, tarsio, mono, gibón, simio), humanos y peces. El término "animal" también incluye un animal individual en todas las etapas de desarrollo, incluidas las etapas embrionaria y fetal. El término "cerdo" o "lechón" significa un animal de origen porcino, mientras que "cerda" se refiere a una hembra
50 en edad y capacidad reproductora.

[0028] *Abreviaturas:* ELISA, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas; Mab, anticuerpo monoclonal; FITC, isotiocianato de fluoresceína; DAPI: tinción de Hoechst (colorante azul fluorescente); DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol; GFP: proteína verde fluorescente; TRITC: tetrametilrodamina; Cy5: Cianina 5.

55 [0029] En el presente documento se describen procedimientos de alto rendimiento para la determinación del título viral de una muestra que contiene un virus.

60 [0030] Los procedimientos de alto rendimiento que se describen en el presente documento comprenden las etapas de: 1) proporcionar una muestra que contiene un virus; 2) preparar diluciones en serie de la muestra; 3) infectar las células huésped con el virus en placas de 96 pocillos e incubar el cultivo; 4) hacer reaccionar un antígeno expresado por el virus en células infectadas con un anticuerpo marcado con una etiqueta fluorescente; 5) determinar el número de células infectadas; y 6) determinar el título de virus en la muestra.

65 [0031] Los ensayos de placa convencionales de la determinación del título del virus que se basan en la detección de inmunofluorescencia requieren mucho tiempo y son muy laboriosos. Implican diluciones en serie y muchos duplicados

para contar los pocillos (en una placa de 96 pocillos) con células infectadas. Las muestras a analizar son limitadas para cada sesión.

[0032] En un aspecto de la realización, el número de células infectadas se determina mediante CellInsight (Thermo Fisher Scientific Inc.) usando una placa de múltiples pocillos. El número de células infectadas en cada pocillo se lee con CellInsight. La placa de múltiples pocillos puede ser una placa de 48 pocillos o una placa de 96 pocillos.

[0033] En otro aspecto de la realización, se traza una línea recta utilizando una regresión lineal entre el número de células de fluorescencia y el título de virus utilizando un virus de referencia. En un aspecto, al menos una de las diluciones en serie de la muestra se encuentra dentro del rango de la línea de regresión lineal. El número de células infectadas por pocillo para la al menos una dilución de la muestra puede estar preferiblemente entre $0,1 \log_{10}$ y $6,0 \log_{10}$.

[0034] Tal como se describe en el presente documento, el procedimiento de la presente invención permite la detección y el control de un virus y células infectadas mediante la detección de un antígeno expresado por el virus en las células huésped hasta el punto de recogida. La rapidez con la que se obtienen estos datos permite un control periódico frecuente del progreso de la infección del cultivo celular. A continuación, el cultivo se puede recoger en un punto que proporcione un alto rendimiento de virus adecuado para el desarrollo y la producción de vacunas o para sembrar un cultivo de células huésped en lotes grandes para la producción final de virus en cantidad suficiente para su uso, por ejemplo, en el desarrollo y producción de vacunas.

[0035] Los cultivos de siembra desarrollados como resultado de la utilización de los procedimientos de la invención se pueden utilizar para sembrar un gran volumen de medio de cultivo celular fresco, en el orden de volúmenes de 5-1000 litros o más. En este procedimiento, el cultivo de siembra recogido se inocula en un cultivo a gran escala que comprende medio de cultivo celular.

[0036] La presente invención, por lo tanto, proporciona un procedimiento de alto rendimiento para el control en proceso y la determinación rápida del punto útil de recogida de un cultivo celular infectado con un virus de manera que se pueda obtener un rendimiento óptimo del virus. Los procedimientos descritos en este documento abarcan proporcionar un cultivo de siembra de células huésped infectadas con virus e inocular un cultivo por lotes con el mismo, incubar el cultivo, extraer las muestras de las células cultivadas, preparar diluciones en serie de las muestras, hacer reaccionar un antígeno expresado por el virus en células infectadas con un anticuerpo marcado con una etiqueta fluorescente, determinar el número de células fluorescentes, determinando así el título del virus en el cultivo por lotes. Se contempla que los procedimientos de la presente invención se pueden aplicar de manera útil para detectar y controlar en proceso la producción de cualquier virus cultivado en células huésped aisladas y para los que hay anticuerpos específicos de antígeno virales disponibles.

[0037] En las diversas realizaciones de este procedimiento de la invención, los virus pueden ser cualquier virus, incluidos virus de ADN, virus de ARN, virus recombinantes, virus que llevan transgenes, baculovirus que expresan antígenos, etc. Los virus pueden incluir adenovirus, retrovirus, virus del herpes simple, parvovirus, virus de la peste porcina clásica, virus de la gripe, circovirus (incluidos los circovirus porcino PCV1 y PCV2), virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, rotavirus, virus de la diarrea viral bovina, virus de la diarrea epidémica porcina, virus sindbis, baculovirus, virus de la pseudorrabia, virus de varicela-zoster, citomegalovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la hepatitis A, B y C, virus de la viruela, virus de la fiebre aftosa, virus de la lengua azul, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la bursitis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek, virus de la laringotraqueítis infecciosa, paramixovirus aviar, virus de Nilo occidental, virus Nipah, virus Hendra, virus de la peste equina africana, virus del moquillo canino, virus de leucemia, calicivirus, virus de Schmallenberg y virus recombinantes de los mismos.

EJEMPLOS

Ejemplo 1 Resumen del ensayo de placa de titulación de virus actual

[0038] Los virus utilizados en este ejemplo fueron parvovirus canino (CPV) y virus de la viruela recombinante (virus de la viruela del canario aviar) que expresan un antígeno de la gripe equina. La línea de células huésped son las células de mieloma canino A72.

Preparación de células huésped

[0039] Se preparó una suspensión fresca de células huésped en medio DMEM + 5% de FCS (suero fetal bovino) a una concentración de 60 000 células/ml. Se añadieron 150 µl de esta suspensión celular a cada pocillo de una placa de 96 pocillos.

Diluciones de la muestra

[0040] Se tomó una alícuota de una muestra que contenía un virus y se llevaron a cabo diluciones en serie en microtubos de acuerdo con, por ejemplo, la tabla mostrada en la Figura 1. El virus de control (virus de referencia) se diluyó siguiendo el mismo procedimiento.

5 Diseño de placas

[0041] Las diluciones preparadas que abarcan el título esperado se dispensaron en la placa tal como se muestra en la Figura 2. A cada pocillo que contenía 150 µl de la suspensión celular, se añadieron 100 µl de las muestras diluidas. Para los controles celulares (línea H) (al menos un control celular por sesión), se agregaron 100 µl de medio de dilución a la suspensión celular. El número de diluciones de la muestra fue de 8. El número de diluciones del virus de control fue de 7. El número de pocillos por dilución es 6. En este diseño de placas, para una placa, se usaron 42 pocillos en total para el virus de control (virus de referencia), se utilizaron 6 pocillos para el control celular y se utilizaron 48 pocillos para analizar una muestra. En algunos casos, se usaron 144 pocillos (una placa y media de 96 pocillos) para leer una muestra, y los tres resultados resultantes por muestra se usaron para calcular la lectura promedio de la muestra.

[0042] En este procedimiento, para calcular un título de una muestra, se necesitan una o dos placas de 96 pocillos para obtener una determinación del título precisa.

20 Infección por virus de células huésped en placas de 96 pocillos

[0043] Las placas se incubaron durante 4 días en una incubadora a alrededor de 37 °C con 5% de CO₂. Al final del período de incubación, los pocillos de control tuvieron que verificarse bajo un microscopio invertido para verificar que la capa celular se completaba sin toxicidad ni contaminación.

25 Fijación de placas para reacción de inmunofluorescencia

[0044] Las placas se fijaron con acetona. Brevemente, las placas se lavaron una vez con solución salina tamponada con fosfato PBS²⁻ sin calcio ni magnesio. Se añadieron 100 µl/pocillo de acetona fría al 90% (10% de agua) a las placas y las placas se incubaron a -20°C durante 30 min. Se descartó la acetona y las placas se secaron completamente al aire.

Reacción de inmunofluorescencia

[0045] Para la reacción de inmunofluorescencia, se añadieron 100 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal (anti-CPV2 para CPV o anti-antígeno de EIV para el antígeno recombinante de la gripe equina y viruela de canario) a las placas y las placas se incubaron a 37 °C durante 30 min. A continuación, las placas se lavaron dos veces con PBS. Se añadieron 100 µl/pocillo de FITC anti-ratón a las placas y las placas se incubaron a 37°C durante 30 min. Las placas se lavaron con PBS dos veces y seguido de un lavado rápido en agua neutra.

40 Cálculo de títulos

[0046] Las placas se leyeron mediante luz UV con filtro 488-519Å. Para la identificación, el pocillo es positivo si una o más células son fluorescentes.

[0047] El cálculo del título se lleva a cabo mediante transformación angular o según el procedimiento de Karber, para el que la fórmula es:

$$T = d + [r/N] \times [n + N/2] + 1$$

50 T = título

d = dilución con el 100% de los pocillos para mostrar un foco fluorescente

r = relación de dilución

N = número de pocillos por tasa de dilución

n = número de pocillos que muestran una fluorescencia para la tasa de dilución superior a d

55 Ejemplo 2 Procedimiento mejorado de titulación de virus de alto rendimiento

[0048] Los virus utilizados en este ejemplo fueron parvovirus canino (CPV) y virus de la viruela recombinante (virus de la viruela aviar del canario) que expresan un antígeno de la gripe equina. La línea de células huésped son las células de mieloma canino A72.

[0049] La preparación de células huésped se llevó a cabo, tal como se describe en el Ejemplo 1.

65 Dilución de la muestra

[0050] La dilución de la muestra se llevó a cabo, tal como se describe en el Ejemplo 1.

Diseño de placas

[0051] En las Figuras 3 y 4 se muestra una placa de muestra. En estos diseños de placas, el número de diluciones de la muestra fue de 4. El número de diluciones del virus de control fue de 7. El número de pocillos por dilución es de 2. Para una placa, se usaron un total de 14 pocillos para el virus de control (virus de referencia), se utilizaron 2 pocillos para el control celular, se utilizaron 8 pocillos para el control de validación por sesión (cada sesión puede contener varias placas) y se utilizaron 8 pocillos para analizar una muestra para un total de 9 muestras. Se utilizó el virus de referencia para trazar la línea de regresión lineal y calcular el título de la muestra desconocida. Las células de control fueron pocillos sin virus para comprobar que la sesión funcionó bien. El control de validación contiene un virus (distinto del virus de referencia) con título conocido. El control de validación se tituló en cada placa y se calculó su título y los resultados se incluyeron en el control gráfico. El control de validación proporciona un control de calidad de la sesión y asegura que la sesión funcionó bien.

[0052] La infección por virus de las células huésped en placas de 96 pocillos, la fijación de las placas para la reacción de inmunofluorescencia y la reacción de inmunofluorescencia se llevaron a cabo como se describe en el Ejemplo 1.

Cálculo de títulos

[0053] El número de células infectadas por pocillo se leyó usando CellInsight. Se traza una línea recta usando regresión lineal entre el número de células de fluorescencia por pocillo y el título de virus usando el virus de control (virus de referencia) como se muestra en la Figura 5 (CPV) y la Figura 7 (virus de la viruela recombinante). El título de virus de una muestra se calcula a continuación utilizando la línea recta (regresión lineal del virus de referencia) basándose en la lectura de las células infectadas por pocillo de esa muestra y su factor de dilución.

Resultados

[0054] El título de virus calculado utilizando el procedimiento mejorado se comparó con el título del virus calculado utilizando el procedimiento convencional. La Figura 6 muestra los resultados para CPV. La Figura 8 muestra los resultados para el virus de la viruela recombinante. Los resultados demostraron que el procedimiento de alto rendimiento que determina las células infectadas se coteja bien con el procedimiento de determinación del título de virus convencional (ensayo en placa convencional) que cuenta los pocillos que contienen células infectadas (células marcadas con fluorescencia).

Discusión

[0055] Este procedimiento de alto rendimiento proporciona la ventaja de reducir el número de diluciones y duplicados que son necesarios para calcular con precisión el título de virus, y por lo tanto el aumento de número de muestras a titular en una placa.

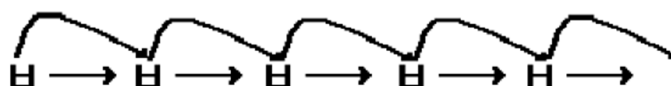
REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de cuantificación de virus que comprende las etapas de:
 - 1) proporcionar una muestra que contiene un virus;
 - 2) preparar diluciones en serie de la muestra;
 - 3) infectar células huésped con el virus e incubar el cultivo;
 - 4) hacer reaccionar un antígeno expresado por el virus en células infectadas con un anticuerpo marcado con una etiqueta fluorescente;
 - 5) determinar el número de células infectadas mediante el uso de un citómetro de imagen en el que el citómetro de imagen es un componente de un único instrumento de sobremesa que combina las funciones de un microscopio digital, dicho citómetro de imagen y un contador de células, preferiblemente en el que dicho citómetro de imagen es capaz de realizar mediciones de células individuales, subcelulares y multicelulares y de capturar datos de imágenes celulares y subcelulares; y
 - 6) determinar el título de virus en la muestra, en el que se traza una línea recta utilizando una regresión lineal entre el número de células marcadas con fluorescencia y el título de virus utilizando un virus de referencia.
2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el procedimiento se lleva a cabo en una placa de múltiples pocillos.
3. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la placa de múltiples pocillos es una placa de 96 pocillos.
4. Procedimiento, según la reivindicación 2, en el que la placa de múltiples pocillos es una placa de 48 pocillos.
5. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que el número de células infectadas se determina leyendo las células marcadas con fluorescencia en cada pocillo.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, en el que la etiqueta fluorescente se selecciona del grupo que consiste en FITC, tinción de Hoechst, DAPI, GFP, TRITC y Cy5.
7. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que al menos una de las diluciones en serie se encuentra dentro del rango de la línea de regresión lineal del virus de referencia.
8. Procedimiento, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que los virus son virus de ADN o virus de ARN.
9. Procedimiento, según la reivindicación 8, en el que los virus son adenovirus, retrovirus, virus del herpes simple, parvovirus, virus de la peste porcina clásica, virus de la gripe, circovirus (incluidos los circovirus porcino PCV1 y PCV2), virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, rotavirus, virus de la diarrea viral bovina, virus de la diarrea epidémica porcina, virus sindbis, baculovirus, virus de la pseudorrabia, virus de varicela-zoster, citomegalovirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la hepatitis A, B y C, virus de la viruela, virus de la fiebre aftosa, virus de la lengua azul, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la bursitis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek, virus de la laringotraqueítis infecciosa, paramixovirus aviar, virus de Nilo occidental, virus Nipah, virus Hendra, virus de la peste equina africana, virus del moquillo canino, virus de leucemia, calicivirus y virus de Schmallenberg.
10. Procedimiento, según la reivindicación 9, en el que los virus son virus recombinantes.
11. Uso del procedimiento, tal como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en un procedimiento de alto rendimiento para el control en proceso y la determinación rápida del punto de recogida útil de un cultivo celular infectado con un virus de tal manera que se puede obtener un rendimiento óptimo.

Figura 1

Muestra de diluciones

ETAPAS



Factor de dilución aritmético	1/10	1/100	1/400	1/1600	1:6400
Factor de dilución en $\log_{10}$	1.0	2.0	2.6	3.2	3.8.....
Microtubos:					
Volumen del medio de dilución	0.1+ 0.9	0.1+ 0.9	0.250+0.750	0.250+0.750	0.250+0.750

Figura 2

Ejemplo de diseño de placas en una ensayo de placas convencional

Log Dilución		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2.6	A												
3.2	B												
3.8	C												
4.4	D												
5.0	E												
5.6	F												
6.2	G												
control celular	H												

Diluciones del virus de control Virus ensayado

Figura 3

Muestra de diseño de placas en titulación de virus de alto rendimiento

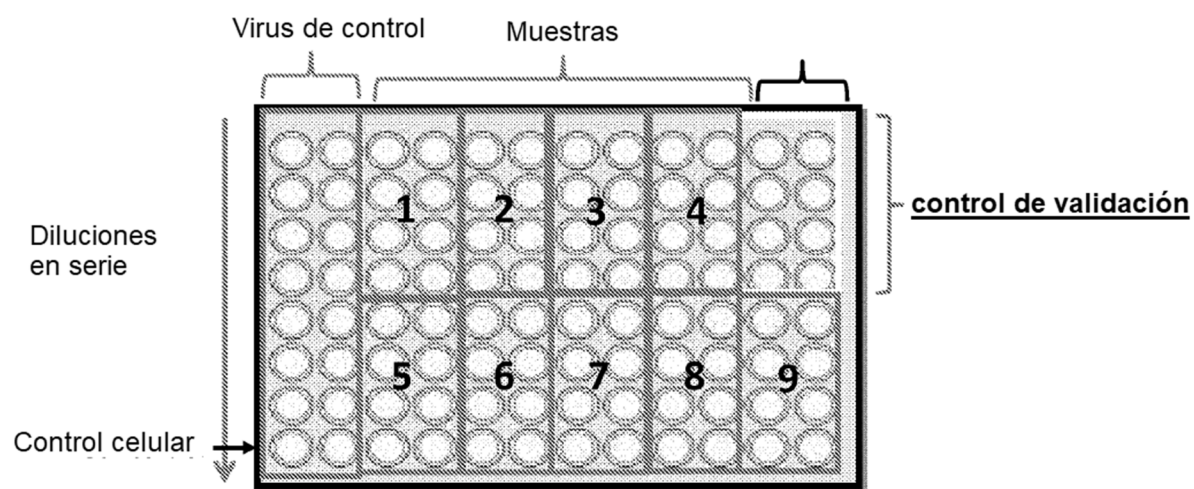


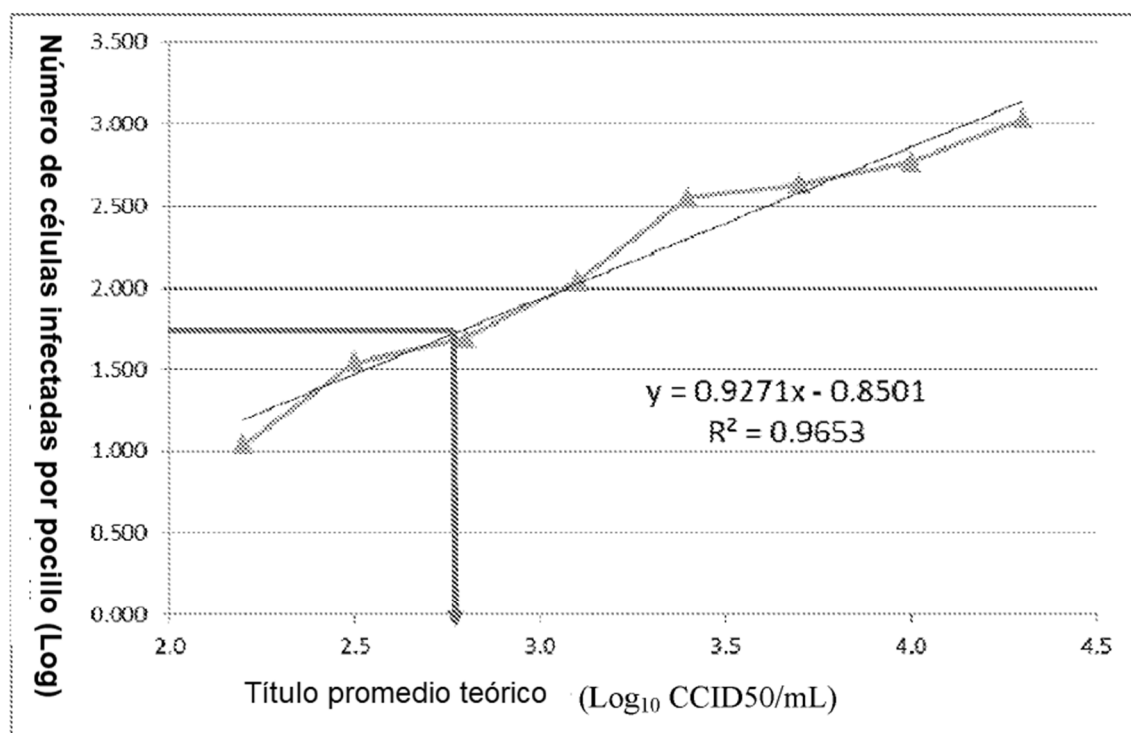
Figura 4

Muestra del diseño de placas en titulación de virus de alto rendimiento

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Virus de control		Muestra 1		Muestra 2		Muestra 3		Muestra 4		Muestra 5	
B												
C												
D												
E			Muestra 6		Muestra 7		Muestra 8		Muestra 9		Control de validación	
F												
G												
H	Control celular											

Figura 5

Regresión lineal de CPV2



CCID: Dosis infecciosa del cultivo celular

Figura 6

Comparación entre el procedimiento de título de virus convencional y el procedimiento de título de virus de alto rendimiento para CPV2

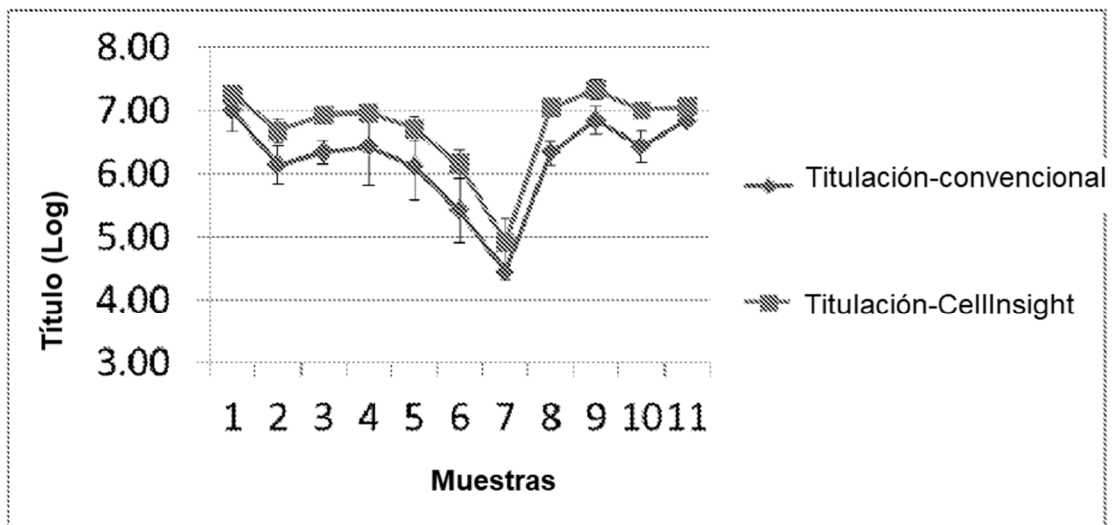


Figura 7

Regresión lineal de virus de la viruela (ALVAC aviar) que expresa un antígeno de gripe equina

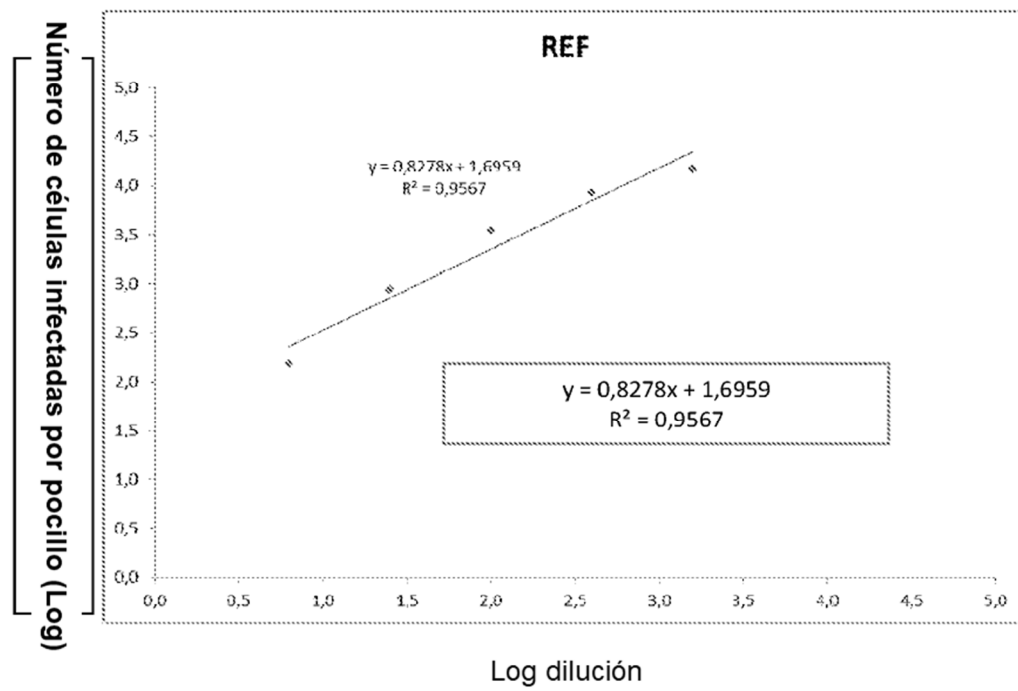


Figura 8

Comparación entre el procedimiento de título de virus convencional y el procedimiento de título de virus de alto rednimiento para el virus de la viruela (aviar ALVAC) que expresa un antígeno de la gripe equina

