

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 580**

51 Int. Cl.:  
**C07K 14/08** (2006.01)  
**C12N 7/00** (2006.01)  
**C12N 15/40** (2006.01)  
**C07K 16/10** (2006.01)  
**A61K 39/21** (2006.01)  
**G01N 33/569** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07700412 .5**  
96 Fecha de presentación: **04.01.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1973931**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **Vacuna contra el virus del pollo y diagnóstico**

30 Prioridad:  
**04.01.2006 GB 0600081**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**26.09.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**26.09.2012**

73 Titular/es:  
**THE QUEEN'S UNIVERSITY OF BELFAST  
UNIVERSITY ROAD  
BELFAST BT7 1NN NORTHERN IRELAND, GB**

72 Inventor/es:  
**TODD, Daniel;  
WYLIE, Mildred y  
BALL, Neris**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 387 580 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**

Vacuna contra el virus del pollo y diagnóstico

**Campo del invento**

5 El presente invento se refiere a vacunas, kits de ensayo y métodos de detección para un nuevo astrovirus, en particular el astrovirus de tipo 3 del pollo (CAstV-3; del inglés, chicken astrovirus-3). Las infecciones de pollos tomateros con este astrovirus de tipo 3 del pollo se asocian con enteritis y depresión del crecimiento y con posibles efectos negativos sobre el desarrollo del embrión de polluelo.

**Antecedentes**

10 Los problemas por depresión del crecimiento en pollos jóvenes, conocidos en la industria de la producción de aves de corral por diversas expresiones tales como "crecimiento retrasado", "enanismo-crecimiento retrasado" y síndrome de "crecimiento desigual", dan lugar a unos considerables costes económicos para las granjas afectadas. Dicha depresión del crecimiento se ha asociado con infecciones por una diversidad de virus que incluyen rotavirus y pequeños virus redondos, aún no caracterizados y conocidos como virus de tipo enterovirus (ELV; del inglés, enterovirus like viruses). Puesto que los problemas clínicos causados por virus específicos están mal definidos a causa de la falta de ensayos diagnósticos específicos, es difícil estimar con precisión la exigencia de una vacuna para proteger de los problemas por depresión del crecimiento provocados por virus.

20 Las infecciones víricas de pollos se pueden transmitir horizontalmente por el virus que puede estar contaminando el alojamiento de los pollos; por ejemplo, con las infecciones entéricas, es probable que sea común una propagación fecal-oral. También se reconoce que puede tener lugar la transmisión vertical de infecciones entéricas a través del embrión de pollos parentales infectados con el virus.

Estudios previos [Veterinary Laboratories Agency (VLA), Weybridge] han mostrado que un virus de tipo enterovirus (ELV), denominado FP3, podría ser detectado en el meconio (contenidos intestinales) de polluelos muertos en su cascarón, lo que sugeriría que este ELV estaba infectando el embrión y se transmitía verticalmente desde los padres infectados [Spackman et al. (1984), Veterinary Record 114: 216-218].

25 Los virus de tipo enterovirus incluyen picornavirus, astrovirus, calicivirus y similares, y pequeños virus esféricos sin envoltura que se replican en el citoplasma. Tienen un genoma de RNA y son estables en un pH de 3. Se ha sugerido que varios ELVs que son antigénicamente distintos entre sí causan depresión del crecimiento en aves.

**Sumario del invento**

30 Después de una amplia investigación virológica de aves enfermas de grupos del Reino Unido en 2004-5, los presentes inventores han aislado exitosamente de polluelos débiles un agente infeccioso. La caracterización de este agente sugiere que este agente vírico causa depresión del crecimiento en pollos jóvenes y posibles efectos negativos sobre embriones de polluelo.

35 De acuerdo con un primer aspecto del presente invento, se proporciona una nueva cepa aislada de astrovirus, denominada CAstV-3. Una muestra de esta cepa ha sido depositada bajo el número de Acceso CNCM I-3541 en el CNCM, Instituto Pasteur, el 15 de diciembre de 2005.

Los astrovirus son pequeños virus esféricos que tienen típicamente una morfología de estrella de 5 ó 6 puntas y un genoma de RNA de cadena sencilla y sentido positivo de aproximadamente 7 kb.

40 Se han caracterizado previamente diversos astrovirus en patos, pavos y gallinas; sin embargo, el astrovirus caracterizado por los presentes inventores es antigénicamente distinto, como se demuestra mediante ensayos de inmunofluorescencia indirecta.

Se ha secuenciado una región sustancial (~ 3,3 kb) del genoma de CAstV-3. Esta región comprende parte del ORF 1b de astrovirus, la RNA polimerasa de astrovirus dependiente de RNA, una pequeña secuencia intergénica de 24 nucleótidos, y el ORF 2 de astrovirus, que codifica la región proteica de la cápsida, y la región 3' no traducida.

45 De acuerdo con un segundo aspecto, el presente invento proporciona una secuencia de nucleótidos aislada que tiene una identidad secuencial de al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, preferiblemente al menos 93%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, aún más preferiblemente al menos 99%, y muy preferiblemente 100%, con respecto a

(a) una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,

(b) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse bajo condiciones rigurosas con una porción de la ID. SEC. nº 4, que codifica un polipéptido antigénico capaz de generar una respuesta inmunogénica contra el astrovirus de tipo 3 del pollo, o

5 (c) un fragmento de la ID. SEC. nº 4, en que dicho fragmento es capaz de codificar una secuencia de aminoácidos de al menos un sitio antigénico proporcionado por una proteína de la cápsida del astrovirus de tipo 3 del pollo (CAstV-3), en que la identidad secuencial se refiere al porcentaje de restos de dos secuencias que son idénticos cuando se alinean éstas para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada, en que la ventana de comparación especificada es todos los restos de las secuencias.

10 Adecuadamente, una secuencia de nucleótidos del invento codifica una secuencia de aminoácidos que es capaz de generar una respuesta inmunogénica contra el astrovirus de tipo 3 del pollo. Adecuadamente, un fragmento de una secuencia de nucleótidos de (a) o (b) codifica una secuencia de aminoácidos que es capaz de generar una respuesta inmunogénica contra el astrovirus de tipo 3 del pollo.

15 Adecuadamente, la respuesta inmunogénica es contra al menos un sitio antigénico proporcionado por una proteína de la cápsida del astrovirus de tipo 3 del pollo (CAstV-3).

El invento proporciona además una construcción génica que incluye al menos una secuencia de nucleótidos del segundo aspecto del invento y una secuencia de control, por ejemplo, un promotor.

20 Se proporciona además un vector que incluye una secuencia aislada de nucleótidos de acuerdo con el segundo aspecto del invento y un promotor que está operativamente enlazado a dicha secuencia de nucleótidos. Los vectores adecuados incluyen virus (por ejemplo, vacciniavirus, adenovirus, baculovirus, etc.), vectores de levadura, fagos, cromosomas, cromosomas artificiales, plásmidos y DNA de cósmido.

De acuerdo con un tercer aspecto del invento, se proporciona un método para producir un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos del invento, o un fragmento del mismo, que incluye las operaciones de:

- 25 (a) poner una célula bacteriana y/o una célula de insecto a través de un baculovirus y/o una célula de levadura y/o una célula vegetal en contacto con un vector como el aquí descrito, y
- (b) cultivar dicha célula bacteriana y/o célula de insecto y/o célula de levadura y/o célula vegetal bajo unas condiciones adecuadas para la producción del polipéptido o el fragmento del mismo.

Adecuadamente, la célula bacteriana puede ser *Escherichia coli*.

30 Adecuadamente, el polipéptido es codificado por una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4.

Adecuadamente, el polipéptido es codificado por una secuencia de nucleótidos del astrovirus de tipo 3 del pollo.

El invento proporciona además un polipéptido producido sustancialmente mediante el método anterior. Como entenderán quienes tienen experiencia en la técnica, dicho polipéptido puede ser aislado o sustancialmente purificado a partir de la mezcla en que se expresa.

35 De acuerdo con un cuarto aspecto del presente invento, se proporciona una secuencia polipeptídica codificada por cualquier secuencia de nucleótidos del segundo aspecto del invento.

Preferiblemente, se proporciona una secuencia polipeptídica codificada por cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4.

40 Adecuadamente, un polipéptido del invento puede ser antigénico ya que presenta al menos un sitio antigénico hacia el cual se puede dirigir una respuesta inmune.

Polipéptidos antigénicos derivados de CAstV-3, por ejemplo, una proteína de la cápsida (ID. SEC. nº 5) o fragmentos de la misma, están dentro del alcance del presente invento.

45 Adecuadamente, se proporciona un polipéptido que tiene una identidad secuencial de al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, preferiblemente al menos 93%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, aún más preferiblemente al menos 99%, y muy preferiblemente 100%, con respecto a un polipéptido con aminoácidos como los expuestos en la ID. SEC. nº 5.

Dentro del alcance del invento están también anticuerpos policlonales y monoclonales que se unen específicamente a un polipéptido del presente invento, como lo está el uso de dichos anticuerpos. Como entenderán quienes tienen

experiencia en la técnica, dichos anticuerpos pueden ser aislados o sustancialmente purificados a partir de la mezcla en que se proporcionan.

De acuerdo con un quinto aspecto del invento, se proporciona

- 5
- (i) el uso de una nueva cepa de astrovirus aislada, denominada CAstV-3, del primer aspecto del invento,
  - (ii) el uso de una secuencia de nucleótidos del segundo aspecto del invento, o
  - (iii) el uso de un polipéptido del cuarto aspecto del invento
- en la preparación de una composición que es capaz de mediar en una respuesta inmune en un ave.

De acuerdo con un sexto aspecto del invento, se proporciona una composición preparada de acuerdo con el quinto aspecto del invento.

- 10
- Adecuadamente, dicha composición incluye al menos parte del nuevo astrovirus aislado del primer aspecto del invento, al menos una secuencia de nucleótidos del segundo aspecto del invento, o al menos un polipéptido del cuarto aspecto del invento.

- 15
- La vacunación, la inducción de inmunidad adaptativa, de pollos tomateros es ventajosa ya que se puede utilizar la vacunación para controlar la enfermedad clínica. Es probable que los polluelos procedentes de padres vacunados sean menos susceptibles a los efectos clínicos negativos causados por el agente infeccioso contra el cual se vacuna durante el periodo de crecimiento temprano del pollo tomatero.

En consecuencia, un séptimo aspecto del presente invento proporciona una vacuna para inmunización frente a la depresión del crecimiento en un ave, en que dicha vacuna comprende una composición de acuerdo con el sexto aspecto para provocar una respuesta inmune en aves.

- 20
- También se describe aquí un método para vacunar aves contra CAstV-3 al proporcionar una cantidad inmunológicamente eficaz de dicha vacuna.

- 25
- El CAstV-3 aislado y/o los nucleótidos del invento y/o los polipéptidos y/o anticuerpos proporcionados por el invento pueden ser utilizados para la preparación de un ensayo diagnóstico del invento. Dichos ensayos pueden ser utilizados para detectar un astrovirus aviar en muestras, tales como, por ejemplo, tejidos, heces y suero de aves de las que se sospecha que están infectadas con el virus.

De acuerdo con un octavo aspecto del presente invento, se proporciona un ensayo diagnóstico para la detección del astrovirus de tipo 3 del pollo en muestras de aves de las que se sospecha que están infectadas con el virus, que comprende las operaciones de:

- 30
- (i) poner un material fisiológico aviar en contacto con una sonda, en que dicha sonda es seleccionada de entre:
    - (a) una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,
    - (b) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse con cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4 bajo condiciones rigurosas,
    - (c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad secuencial de al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, preferiblemente al menos 93%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, aún más preferiblemente al menos 99%, y muy preferiblemente 100%, con respecto a una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de (a) a (b),
    - (d) un fragmento de (a), (b) o (c),
    - (e) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de (a) a (d),  
o
    - (f) un anticuerpo con especificidad ligante hacia un polipéptido de (e), y
  - (ii) detectar un proceso de unión exitoso entre la sonda y al menos un componente de la muestra.

Adecuadamente, dicha sonda puede ser seleccionada de entre:

- (a) una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,

(b) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse con cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4 bajo condiciones rigurosas,

(c) un fragmento de (a) o (b),

(d) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de (a) a (c), o

5 (e) un anticuerpo con especificidad ligante hacia un polipéptido de (d).

En una realización particular, una sonda puede ser un adecuado conjunto de cebadores para uso en una RT-PCR para multiplicar una seleccionada secuencia diana del astrovirus de tipo 3 del pollo.

10 Adecuadamente, el fragmento codifica un polipéptido capaz de generar una respuesta antigénica similar a la proporcionada por un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias nucleotídicas de ID. SEC. números 1 a 4.

Adecuadamente, el proceso de unión es detectado utilizando un marcador asociado con la sonda, tal como, por ejemplo, un marcador fluorescente, un marcador radioisotópico o similar.

En una realización, el ensayo comprende las operaciones de:

15 (i) poner un material fisiológico aviar, por ejemplo, sangre, que contiene anticuerpos que se unen específicamente a al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo, en contacto con al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo, en que dicha al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo ha sido preferiblemente inmovilizada sobre una superficie sólida, por lo que dichos anticuerpos son capaces de unirse a la al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo, y

(ii) detectar la presencia de dichos anticuerpos unidos.

20 En otra realización, un método de ensayo diagnóstico puede comprender las operaciones de:

(i) poner una muestra de material fisiológico aviar, por ejemplo, heces que contienen el astrovirus aviar de tipo 3, en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo, anticuerpo que ha sido preferiblemente inmovilizado sobre un sustrato sólido, por lo que dicho anticuerpo es capaz de unirse a dicho astrovirus aviar de tipo 3, y

25 (ii) detectar la presencia de dicho virus unido.

El virus capturado puede ser detectado por medio del uso de un anticuerpo con especificidad hacia el virus en forma conjugada, como es sabido por quienes tienen experiencia en la técnica.

En otra realización, un método de ensayo diagnóstico puede comprender las operaciones de:

(i) obtener material genético de material fisiológico aviar, y

30 (ii) examinar el material genético para detectar cualquier material genético del astrovirus de tipo 3 del pollo.

Adecuadamente, una sonda puede ser una secuencia de ácido nucleico capaz de unirse a una secuencia de nucleótidos del invento, preferiblemente una secuencia de nucleótidos del astrovirus de tipo 3 del pollo, preferiblemente una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4.

35 Adecuadamente, una sonda puede ser un conjunto de cebadores capaces de unirse a una secuencia de nucleótidos del astrovirus de tipo 3 del pollo, preferiblemente una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4, para permitir la multiplicación de una secuencia por medio de RT-PCR.

De acuerdo con otro aspecto del presente invento, se proporciona un kit diagnóstico para uso en el diagnóstico del astrovirus de tipo 3 del pollo (CAstV-3), que incluye una sonda, en que dicha sonda es al menos una de

(a) una secuencia como la expuesta en cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,

40 (b) una secuencia que es capaz de hibridarse con cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4 bajo condiciones rigurosas,

(c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad secuencial de al menos 85%, preferiblemente al menos 90%, preferiblemente al menos 93%, más preferiblemente al menos 95%, más preferiblemente al menos 98%, aún más preferiblemente al menos 99%, y muy preferiblemente 100%, con respecto a una secuencia de

nucleótidos como la expuesta en cualquiera de (a) y (b),

(d) un fragmento de (a), (b) o (c),

(e) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de (a) a (d), o

(f) un anticuerpo con especificidad ligante hacia un polipéptido de (e).

- 5 Adecuadamente, el fragmento codifica un polipéptido capaz de generar una respuesta antigénica similar a la proporcionada por un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias nucleotídicas de ID. SEC. números 1 a 4.

Adecuadamente, la sonda es asociada con un marcador, tal como, por ejemplo, un marcador fluorescente, un marcador radioisotópico o similar.

## 10 Descripción detallada

### Virus

El invento se refiere al astrovirus aislado de tipo 3 del pollo y a la caracterización de las secuencias de nucleótidos y el polipéptido de dicho virus.

- 15 La comparación de la identidad de los aminoácidos de CAstV-3 por parejas, llevada a cabo por los inventores, con los de otros astrovirus aviares sugiere que la homología más estrecha que comparte con astrovirus conocidos es con CAstV-2. La identidad de aminoácidos por parejas entre CAstV-3 y CAstV-2 es 84,6%.

- 20 En relación con las secuencias de nucleótidos proporcionadas por el invento, se determina la identidad de secuencias usando un algoritmo matemático adecuado. Se pueden usar implementaciones informáticas de dichos algoritmos matemáticos para la comparación de secuencias con objeto de determinar la identidad de secuencias. Dichas implementaciones incluyen, pero no se limitan a: CLUSTAL en el programa PC/Gene (asequible de Intelligenetics, Mountain View, California, EE.UU.); el programa ALIGN (versión 2.0) y GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package, versión 8 [asequible de Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, EE.UU.).

- 25 Adecuadamente, los alineamientos utilizando estos programas pueden ser llevados a cabo usando los parámetros por omisión.

Como aquí se utiliza, "identidad de secuencias" o "identidad", en el contexto de dos secuencias nucleotídicas o polipeptídicas, hace referencia a un porcentaje especificado de restos de las dos secuencias que son iguales cuando éstas se alinean para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada, según se mide mediante algoritmos para comparación de secuencias o mediante una inspección visual.

- 30 Adecuadamente, la ventana de comparación especificada es seleccionada de una secuencia que codifica o representa al menos 50, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250 o, muy preferiblemente, todos los aminoácidos de un polipéptido especificado que se alinea.

- 35 Cuando el porcentaje de identidad de secuencias se utiliza en referencia a proteínas, quienes tienen experiencia en la técnica entenderán que posiciones de restos que no son idénticas a menudo difieren por sustituciones de aminoácido conservativas, es decir, aquéllas en que se sustituyen aminoácidos por aminoácidos que tienen unas propiedades químicas similares a los de los aminoácidos que se reemplazan. El porcentaje de identidad de secuencias puede ser ajustado al alza para corregir la naturaleza conservativa de una sustitución.

- 40 La hibridación se refiere a la unión, formación de dúplex o hibridación de una molécula solamente con una secuencia de nucleótidos particular bajo condiciones rigurosas cuando esa secuencia está presente en una mezcla compleja (por ejemplo, DNA o RNA celular total).

- 45 La hibridación rigurosa tiene lugar cuando un ácido nucleico se une al ácido nucleico diana con una mínima señal de fondo. Típicamente, para conseguir una hibridación rigurosa, se utilizan temperaturas de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 20 °C, más preferiblemente de 5 °C a aproximadamente 20 °C, por debajo de la T<sub>m</sub> (temperatura de fusión a la cual la mitad de las moléculas se disocian de sus compañeros). Sin embargo, viene además definida por la fuerza iónica y el pH de la disolución.

Un ejemplo de unas condiciones de lavado muy rigurosas es NaCl 0,15 M a 72 °C durante aproximadamente 15 minutos. Un ejemplo de una condición de lavado rigurosa es un lavado con SSC 0,2x a 65 °C durante 15 minutos (véase Sambrook y Rusell más adelante para una descripción del tampón de SSC). A menudo, un lavado de alto

- 5 rigor va precedido de un lavado de bajo rigor para eliminar la señal de fondo de la sonda. Un ejemplo de un lavado de rigor medio para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 1x a 45 °C durante 15 minutos. Un ejemplo de un lavado de bajo rigor para un dúplex de, por ejemplo, más de 100 nucleótidos, es SSC 4-6x a 40 °C durante 15 minutos. Para sondas cortas (de, por ejemplo, aproximadamente 10 a 50 nucleótidos), las condiciones rigurosas implican típicamente concentraciones salinas inferiores a aproximadamente 1,5 M, más preferiblemente de aproximadamente 0,01 a 1,0 M, de ion Na (u otras sales) en un pH de 7,0 a 8,3, y la temperatura es típicamente al menos aproximadamente 30 °C, y al menos aproximadamente 60 °C para sondas largas (por ejemplo, > 50 nucleótidos).
- 10 Adecuadamente, las secuencias de nucleótidos del presente invento codifican polipéptidos antigénicos del astrovirus de tipo 3 del pollo.
- Adecuadamente, el presente invento proporciona una secuencia de nucleótidos aislada, seleccionada de entre
- (a) una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,
  - (b) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse con cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4 bajo condiciones rigurosas, y
  - 15 (c) un fragmento de (a) o (b).
- En realizaciones específicas, las secuencias de nucleótidos del invento consisten en cualquiera de las secuencias de nucleótidos seleccionadas de entre las ID. SEC. números 1, 2, 3 y/o 4.
- Adecuadamente, las secuencias de nucleótidos del presente invento se pueden expresar para obtener los polipéptidos codificados.
- 20 Preferiblemente, los polipéptidos del presente invento incluyen polipéptidos codificados por una secuencia de nucleótidos seleccionada de entre
- (a) una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,
  - (b) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse con cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4 bajo condiciones rigurosas, y
  - 25 (c) un fragmento de (a) o (b).
- Los fragmentos polipeptídicos del presente invento pueden ser una variante de cualquiera de los polipéptidos codificados por cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4 que incluya uno o más truncamientos, sustituciones, supresiones o inserciones, en que dichos polipéptidos proporcionan una respuesta antigénica similar a la de cualquiera de los polipéptidos codificados por las ID. SEC. números 1 a 4. Ventajosamente, se pueden realizar estas variaciones en la proteína para potenciar la eficacia de la proteína en cuanto a estimular una respuesta inmune o para hacerla más segura para uso en un ave.
- 30 La longitud de dicho fragmento que proporciona una respuesta inmune comprende al menos 6, hasta 15, preferiblemente 25, y más preferiblemente 50, aminoácidos contiguos codificados por cualquiera de la ID. SEC. nº 1 a la ID. SEC. nº 4. Se puede generar un fragmento antigénico utilizando, por ejemplo, una supresión C-terminal en cualquiera de las secuencias polinucleotídicas de ID. SEC. nº 1 a ID. SEC. nº 4, y dichas construcciones con supresión C-terminal se pueden insertar luego en un adecuado plásmido de expresión procariótico o eucariótico. La actividad antigénica de los productos de expresión derivados de los fragmentos polinucleotídicos puede ser luego examinada evaluando su reactividad con antisueros de pollos natural y/o experimentalmente infectados, usando métodos de inmunotransferencia.
- 35 Alternativamente, se podría generar una serie de péptidos sintéticos solapantes especificados por la secuencia de las proteínas de CAstV-3, preferiblemente la proteína de la cápsida. Estos péptidos pueden ser luego hechos reaccionar con antisueros de pollos natural o experimentalmente infectados, utilizando un método de ELISA para determinar qué péptidos son antigénicos. Además, se pueden utilizar péptidos sintéticos para inmunizar ratones, conejos y pollos, y los antisueros producidos pueden ser evaluados en cuanto a su reactividad con CAstV-3 usando ensayos de inmunofluorescencia indirecta. De este modo, se pueden identificar péptidos inmunogénicos y se pueden obtener antisueros víricamente específicos. Estos dos últimos planteamientos descritos son particularmente ventajosos para péptidos pequeños que contienen epítomos lineales continuos.
- 40 Adecuadamente, el invento proporciona un polipéptido con una secuencia de aminoácidos en que entre 1 y 5, 1 y 10, 1 y 15, o 1 y 20, restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos y/o añadidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por las secuencias de nucleótidos de cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4, y en que
- 50

dichos polipéptidos estimulan una respuesta inmune (es decir, tienen actividad antigénica).

En realizaciones específicas, las secuencias de nucleótidos del invento codifican un polipéptido del punto (a) o (b) siguiente:

- 5 (a) un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 5;
- (b) una proteína que comprende una secuencia de aminoácidos en que uno o varios restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos y/o añadidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 5, en que dicha proteína presenta una respuesta antigénica similar a la de la ID. SEC. nº 5.

En realizaciones particulares, las secuencias de nucleótidos del invento codifican un polipéptido del punto (a) o (b) siguiente:

- 10 (a) un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 5,
- (b) una proteína que consiste en una secuencia de aminoácidos en que uno o varios restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos y/o añadidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de la ID. SEC. nº 5, en que dicha proteína presenta una respuesta antigénica similar a la de la ID. SEC. nº 5.

15 Las secuencias de nucleótidos pueden estar optimizadas en cuanto a codones o, de otro modo, modificadas para aumentar la eficacia de expresión de los polipéptidos.

Adecuadamente, el invento proporciona polipéptidos que consisten en una secuencia de aminoácidos ID. SEC. nº 5.

20 Se pueden producir sueros con anticuerpos policlonales por medio del uso de al menos parte de CAstV-3 para generar una respuesta inmune. La preparación inmunizante podría ser un virus purificado procedente de cultivo celular, péptidos sintéticos víricamente específicos, polipéptidos producidos por vectores de expresión, etc.; y plásmidos de expresión de DNA. Después de una estimulación repetida, se pueden retirar porciones del suero sanguíneo y se pueden purificar antigénicamente. Los sueros semipurificados pueden ser adicionalmente purificados usando la cromatografía, tal como, por ejemplo, una columna de gel de sacárido y un tampón adecuado, para separar los componentes de los sueros de acuerdo con su peso molecular. Adecuadamente, el invento proporciona anticuerpos policlonales que presentan especificidad ligante hacia al menos un polipéptido del invento.

25 Adecuadamente, el invento proporciona anticuerpos policlonales que presentan especificidad ligante hacia

- (a) al menos una secuencia polipeptídica codificada por una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,
- 30 (b) al menos una secuencia polipeptídica que comprende una secuencia de aminoácidos en que uno o varios restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos y/o añadidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4, en que dicho polipéptido presenta una respuesta antigénica similar a la de un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de nucleótidos de ID. SEC. números 1 a 4, o
- (c) un fragmento del polipéptido de (a) o (b), que presenta una respuesta antigénica similar a la de un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de nucleótidos de ID. SEC. números 1 a 4.

35 Adecuadamente, el invento proporciona anticuerpos policlonales que presentan especificidad ligante hacia

- (a) al menos una secuencia polipeptídica codificada por una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las ID. SEC. números 1 y/o 2 y/o 4,
- 40 (b) al menos un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en que uno o varios restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos y/o añadidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las ID. SEC. números 1 y/o 2 y/o 4, en que dicho polipéptido presenta una respuesta antigénica similar a la de un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de nucleótidos de ID. SEC. números 1 y/o 2 y/o 4, o
- (c) un fragmento del polipéptido de (a) o (b), que presenta una respuesta antigénica similar a la de un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de nucleótidos de ID. SEC. números 1, 2 y 4.

45 Adecuadamente, dicho anticuerpo policlonal no presenta especificidad ligante hacia polipéptidos codificados por la ID. SEC. nº 3.

Preferiblemente, el invento proporciona anticuerpos policlonales que presentan especificidad ligante hacia (a), (b) o



(c), en que

(a) es al menos un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 5,

5 (b) es al menos un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en que uno o varios restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos y/o añadidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 5, en que dicho polipéptido presenta una respuesta antigénica similar a la de la ID. SEC. nº 5, y

(c) es un fragmento del polipéptido de (a) o (b), que presenta una respuesta antigénica similar a la de la ID. SEC. nº 5.

Se pueden producir anticuerpos monoclonales mediante la técnica de hibridomas; por ejemplo, se puede utilizar la inmunización de un ratón para generar anticuerpos monoclonales de ratón.

10 Adecuadamente, el invento proporciona un anticuerpo monoclonal que presenta especificidad ligante hacia al menos un polipéptido del invento.

Adecuadamente, el invento proporciona un anticuerpo monoclonal que presenta especificidad ligante hacia:

(a) al menos una secuencia polipeptídica codificada por una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,

15 (b) al menos un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en que uno o varios restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos y/o añadidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4, en que dicha proteína presenta una respuesta antigénica similar a la de un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de nucleótidos de ID. SEC. números 1 a 4, o

20 (c) un fragmento del polipéptido de (a) o (b), que presenta una respuesta antigénica similar a la de un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de nucleótidos de ID. SEC. números 1 a 4.

Adecuadamente, el invento proporciona un anticuerpo monoclonal que presenta especificidad ligante hacia:

(a) al menos una secuencia polipeptídica codificada por una secuencia de nucleótidos de cualquiera de las ID. SEC. números 1 y/o 2 y/o 4,

25 (b) al menos un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en que uno o varios restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos y/o añadidos con respecto a la secuencia de aminoácidos codificada por cualquiera de las ID. SEC. números 1 y/o 2 y/o 4, en que dicho polipéptido presenta una respuesta antigénica similar a la de un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de nucleótidos de ID. SEC. números 1 y/o 2 y/o 4, o

30 (c) un fragmento del polipéptido de (a) o (b), que presenta una respuesta antigénica similar a la de un polipéptido codificado por cualquiera de las secuencias de nucleótidos de ID. SEC. números 1, 2 y 4.

Adecuadamente, dicho anticuerpo monoclonal no presenta especificidad ligante hacia polipéptidos codificados por la ID. SEC. nº 3.

Preferiblemente, el invento proporciona un anticuerpo monoclonal que presenta especificidad ligante hacia (a), (b) o (c), en que

35 (a) es un polipéptido con la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 5,

(b) es al menos un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos en que uno o varios restos de aminoácido están suprimidos, sustituidos y/o añadidos con respecto a la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 5, en que dicha proteína presenta una respuesta antigénica similar a la de la ID. SEC. nº 5, y

40 (c) es un fragmento del polipéptido de (a) o (b) y presenta una respuesta antigénica similar a la de la ID. SEC. nº 5.

La inmunización para obtener anticuerpos monoclonales puede ser llevada a cabo, por ejemplo, del modo detallado más adelante o puede implicar una combinación de más de uno de estos tres métodos:

1) se puede purificar CAstV-3 a partir de virus embrionariamente desarrollado o de virus presente en heces aviares infectadas, por ejemplo, heces de pollo, y se puede utilizar para inmunización;

45 2) se pueden inmunizar ratones con proteína recombinante de astrovirus de tipo 3 del pollo, por ejemplo, CAstV-3,

producida por expresión de una secuencia polinucleotídica de astrovirus de tipo 3 del pollo (preferiblemente, una secuencia polinucleotídica que codifica una proteína de la cápsida) en células de *E. coli*, levadura, vegetal o insecto infectadas con un baculovirus recombinante; y

- 5 3) se pueden inmunizar ratones con un plásmido de expresión de DNA capaz de expresar una secuencia polinucleotídica de astrovirus aviar de tipo 3, por ejemplo, una secuencia polinucleotídica de CAstV-3 que incluye al menos una de las ID. SEC. números 1 a 4.

Como se indicó anteriormente, estas preparaciones pueden ser también usadas para producir anticuerpos policlonales.

- 10 La presencia de anticuerpos hacia astrovirus aviar de tipo 3, por ejemplo, CAstV-3, en los ratones inmunizados puede ser detectada utilizando un ensayo de inmunofluorescencia indirecta (IIF; del inglés, indirect immunofluorescence).

Se pueden preparar células de hibridoma a partir de los bazos extraídos de los ratones inmunizados y, usando un ensayo de IIF, se pueden explorar los cultivos celulares clonados en cuanto a sus capacidades para secretar anticuerpos viralmente específicos.

- 15 Los anticuerpos producidos en un animal tratado con una proteína del presente invento pueden ser aislados y pueden ser utilizados como un ensayo y/o con fines de ensayo.

En particular, el invento proporciona el uso de un anticuerpo que presenta especificidad ligante hacia polipéptidos codificados por cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4 en un ensayo diagnóstico.

- 20 Cómo apreciarán los expertos en la técnica, se debería considerar que un "anticuerpo" abarca cualquier elemento o sustancia ligante que tenga un dominio ligante con la especificidad requerida. El anticuerpo puede ser producido naturalmente o ser sintéticamente producido de forma parcial o total. El término también abarca cualquier polipéptido, proteína o péptido que tenga un dominio ligante que sea, o sea homólogo de, un dominio ligante de anticuerpo. Estos pueden proceder de fuentes naturales o pueden ser sintéticamente producidos de forma parcial o total. Son ejemplos de anticuerpos los isotipos inmunoglobulínicos y sus fragmentos y subclases isotípicas que
- 25 comprenden un dominio ligante de antígenos, tales como Fab, scFv, Fv, dAb, Fd y diacuerpos.

El ave puede ser un pollo, pavo, pato, codorniz, ganso, avestruz, faisán, pavo real, pintada, paloma, cisne, gallina bantam y/o pingüino.

#### **Tratamiento**

- 30 Se puede utilizar un virus, una secuencia de ácido nucleico, una proteína o un anticuerpo del invento para modificar el sistema inmune de un ave. Dicha modulación puede ser utilizada para tratar un ave.

El tratamiento incluye cualquier régimen que pueda beneficiar a un ave. El tratamiento puede ser con respecto a un estado existente o puede ser profiláctico (tratamiento preventivo). El tratamiento puede incluir efectos curativos, aliviadores o profilácticos.

- 35 El tratamiento puede ser proporcionado a través de cualquier vía adecuada. La dosis exacta dependerá de diversos factores, tales como, por ejemplo, la naturaleza exacta del antígeno de la vacuna y el uso de adyuvantes particulares.

#### **Vacuna o composición para mediar en una respuesta inmune**

- 40 Una vacuna o composición para mediar en una respuesta inmune del presente invento puede comprender un virus vivo, un virus atenuado vivo o CAstV-3 inactivado. Adecuadamente, una vacuna del presente invento puede comprender derivados inmunogénicos y/o al menos parte de CAstV-3, incluyendo, por ejemplo, subunidades antigénicas, vectores capaces de expresar las secuencias de nucleótidos del invento, incluyendo secuencias de nucleótidos de CAstV-3, las ID. SEC. números 1 a 4, por ejemplo, una vacuna de DNA que codifique un polipéptido del invento, por ejemplo, una proteína de la cápsida de CAstV-3 (ID. SEC. nº 5), astrovirus recombinante de tipo 3 del pollo, vacunas de péptidos sintéticos, y similares.

- 45 Adecuadamente, para inactivar el virus, se puede utilizar un agente inactivador químico estándar, tal como un reactivo aldehídico que incluye formol, acetaldehído y similares. Alternativamente, se puede utilizar la irradiación (por ejemplo, irradiación con luz ultravioleta o radiación gamma) del virus o se puede cultivar repetidamente el virus en cultivo celular de origen no aviar para que se pierda su capacidad para reproducirse virulentamente.

Una vacuna del presente invento puede ser utilizada en aves para su inmunización frente a la depresión del

crecimiento.

5 Se pueden utilizar derivados de polipéptidos del presente invento para mediar en la respuesta inmune. Los polipéptidos del invento pueden ser adecuadamente enlazados a un compañero de copulación, tal como, por ejemplo, una molécula efectora, una etiqueta, un fármaco, una toxina y/o un vehículo o molécula de transporte. Las técnicas para copular los polipéptidos del invento con compañeros de copulación tanto peptidílicos como no peptidílicos son bien conocidas en este campo técnico.

Adecuadamente, la vacuna puede comprender un vehículo o diluyente farmacéutico, tal como, por ejemplo, disolución salina fisiológica, propilenglicol o similar.

10 Adecuadamente, la vacuna puede comprender un adyuvante, tal como, por ejemplo, adyuvante incompleto de Freund.

#### **Método de vacunación**

La vacuna puede ser administrada oral, parenteral, intranasal o intravenosamente. En la dosificación de la vacuna proporcionada se tendrán típicamente en cuenta la edad y/o el peso y/o el estado físico del ave.

15 Adecuadamente, la vacuna puede ser proporcionada en agua potable o un pulverizador o como un aerosol, para la vacunación masiva de aves de corral tales como, pero sin limitarse a, pollos y pavos.

En una realización se puede preparar una vacuna como una vacuna viva, que será administrada a través del agua potable o mediante un pulverizador. Dicha vacuna puede estar sin atenuar ya que es probable que las infecciones de las aves reproductoras en crecimiento (es decir, de 10 semanas y más) no den lugar a efectos patógenos [es probable que las infecciones de polluelos muy jóvenes (por ejemplo, de 0-3 semanas) sean patógenas].

20 En una segunda realización, se puede preparar una vacuna como un virus atenuado que puede ser producido al desarrollarse el virus en embriones o cultivos celulares. Dicha vacuna atenuada podría ser también administrada a través del agua potable o mediante un pulverizador. También es posible que se pueda administrar por inoculación (por ejemplo, por vía subcutánea) un virus CAstV-3 atenuado o no atenuado.

25 En una tercera realización, se puede preparar una vacuna como un virus muerto o inactivado. El virus inactivado (muerto) puede ser administrado por inoculación. El adyuvante utilizado con el virus inactivado será probablemente importante a la hora de maximizar la respuesta inmune provocada.

30 En una cuarta realización, se puede preparar una vacuna como una vacuna subunitaria recombinante. Se puede adoptar este planteamiento, por ejemplo, si las vacunas vivas no son eficaces y si resulta demasiado caro producir vacunas inactivadas. La vacuna subunitaria recombinante se puede basar en la expresión de proteína de cápsida en células de *E. coli*, levadura, vegetal o insecto infectadas por un baculovirus recombinante. En dicha realización, se puede utilizar al menos parte de CAstV-3 para preparar la vacuna; por ejemplo, se puede utilizar una proteína de CAstV-3 (preferiblemente, una proteína estructural). Dicha proteína puede ser producida mediante metodologías de expresión de DNA recombinante o por cultivo del virus.

35 Adecuadamente, la vacuna contra el astrovirus aviar de tipo 3, por ejemplo, CAstV-3, puede comprender además antígenos de otros agentes, por ejemplo, otros virus aviares, más específicamente otros virus del pollo, como parte de una vacuna de combinación.

#### **Método de ensayo**

En realizaciones particulares, un ensayo del invento comprende las operaciones:

- obtener una muestra de un ave,
- 40 – poner en contacto con la muestra un anticuerpo capaz de unirse específicamente a al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo (CAstV-3), y
- detectar la unión del anticuerpo a CAstV-3 en la muestra, en que la unión del anticuerpo al astrovirus de tipo 3 del pollo en la muestra es indicativa de la presencia de CAstV-3 en el ave.

45 Adecuadamente, el anticuerpo capaz de unirse específicamente al astrovirus de tipo 3 del pollo es capaz de unirse a un polipéptido codificado por las ID. SEC. números 1 a 4, más preferiblemente un polipéptido codificado por la ID. SEC. nº 1, 2 ó 4, más preferiblemente un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 5 o al menos parte del polipéptido de ID. SEC. nº 5 que es antigénica.

En realizaciones alternativas, un ensayo del invento comprende las operaciones de:

- poner en contacto con la muestra al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo, y
- detectar la presencia o ausencia de la unión de al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo a un anticuerpo en la muestra, en que la unión de la al menos parte del astrovirus aislado de tipo 3 del pollo a un anticuerpo es indicativa de la presencia de anticuerpos hacia el astrovirus de tipo 3 del pollo en el ave.

5 En otras realizaciones alternativas, un ensayo del invento comprende las operaciones de:

- (i) obtener material genético, y
- (ii) examinar el material genético para detectar cualquier material genético del astrovirus de tipo 3 del pollo.

Adecuadamente, el material genético es de un ave y puede ser RNA de un ave, por ejemplo, un pollo.

10 Adecuadamente, el material genético se puede obtener de plumas, huevos, sangre, heces, intestinos y contenido intestinal, tejidos y similares de un ave.

Se dispone de diversos kits comerciales para extraer RNA de muestras tisulares. Estos son bien conocidos por los expertos en la técnica.

La persona experta estará al tanto de una diversidad de métodos de detección para detectar material genético en muestras.

15 Adecuadamente, el método implica el uso de una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR; del inglés, reverse transcription-polymerase chain reaction). En una realización particularmente preferida, el método de detección comprende las operaciones de:

- (i) obtener cebadores directos e inversos para una polimerasa de ácido nucleico, cebadores que son capaces de unirse específicamente a una secuencia polinucleotídica del astrovirus de tipo 3 del pollo;

20 (ii) multiplicar la secuencia polinucleotídica entre los cebadores; y

- (iii) detectar la secuencia polinucleotídica multiplicada;

en que la detección de múltiples copias de la secuencia polinucleotídica multiplicada en la muestra es indicativa de la presencia del astrovirus de tipo 3 del pollo en la muestra.

25 La base de este ensayo es que se producirá un producto de cDNA positivo si las dos pequeñas secuencias cebadoras encuentran equivalencias secuenciales exactas o muy próximas en el RNA extraído de las muestras de ensayo.

30 Los cebadores directo e inverso para una polimerasa de ácido nucleico adecuada para uso en el invento pueden ser seleccionados de cualesquier secuencias adecuadas presentes en el genoma de CAstV-3. La persona experta apreciará los factores que es necesario tener en cuenta cuando se diseñan cebadores adecuados, tal como, por ejemplo, el uso de comparaciones secuenciales para determinar regiones de secuencia conservadas para las que se pueden diseñar cebadores directos e inversos.

Adecuadamente, los cebadores pueden tener la secuencia:

Directo: 5' - AGC CTC AAA GTA TAA GAC GCA G-3', ID. SEC. nº 6

Inverso: 5' - CCA TGC TAT TTC AAA GGT GGT T-3', ID. SEC. nº 7.

35 Ventajosamente, utilizando dichos cebadores, se proporciona un ensayo entre 10, preferiblemente 20, más preferiblemente 30, y muy preferiblemente 100 veces más sensible que un método en que se utiliza la detección por inmunofluorescencia indirecta de antígeno vírico producido al inocular muestras que contienen virus en células hepáticas embrionarias primarias de polluelo.

40 Preferiblemente, el método de ensayo proporciona información cuantitativa sobre la cantidad de virus presente en la muestra.

Ventajosamente, los cebadores pueden ser fluorescentemente etiquetados y el ensayo comprende la operación adicional de determinar si los cebadores se han unido a la secuencia polinucleotídica determinando las emisiones fluorescentes del cebador.

Adecuadamente, las etiquetas fluorescentes se encuentran dentro del conocimiento general común de las personas

expertas.

Preferiblemente, el método de ensayo del invento es específico para el astrovirus de tipo 3 del pollo como ha sido depositado bajo el número de Acceso CNCM I-3541 en el CNCM, Instituto Pasteur, el 15 de diciembre de 2005.

5 En un ensayo del presente invento se puede utilizar cualquier muestra adecuada; por ejemplo, se puede utilizar una muestra de un ave, por ejemplo, un pollo, y se puede utilizar un tejido donde se replique el virus, por ejemplo, el intestino. Alternativamente, la muestra puede ser sangre o heces.

Preferiblemente, la muestra para diagnóstico puede ser seleccionada de heces, contenido intestinal o torunda fecal.

10 Adecuadamente, cuando la muestra es heces y/o contenido intestinal, se preparan suspensiones de virus crudas como productos de homogeneización al 10% en disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline). Estos pueden ser clarificados utilizando una centrifugación a 3000g durante 30 minutos, y se extrae una parte alícuota (por ejemplo, 200 microlitros) del extracto clarificado. Con torundas, se pueden preparar suspensiones en 1-2 ml de PBS y se pueden clarificar del modo anterior antes de la extracción.

### Kit diagnóstico

15 En ejemplos particulares de kits diagnósticos de ensayo proporcionados por el invento para la detección de astrovirus de tipo 3 del pollo en muestras de aves de las que se sospecha que están infectadas con el virus, el kit de ensayo comprende al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo, una secuencia de nucleótidos del invento, un polipéptido del invento, y un anticuerpo policlonal del invento o un anticuerpo monoclonal del invento.

20 La al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo, la secuencia de nucleótidos del invento, el polipéptido del invento, el anticuerpo policlonal del invento o el anticuerpo monoclonal del invento puede estar unido a un sustrato para que una muestra de ensayo pueda ser dispuesta sobre, o bañada con, la al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo, la secuencia de nucleótidos del invento, el polipéptido del invento, el anticuerpo policlonal del invento o el anticuerpo monoclonal del invento.

25 En ejemplos específicos, un kit diagnóstico de ensayo del invento para la detección de astrovirus de tipo 3 del pollo en muestras de aves de las que se sospecha que están infectadas con el virus comprende anticuerpos con especificidad ligante hacia al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo. Adecuadamente, los anticuerpos pueden estar unidos a un sustrato para que una muestra de ensayo pueda ser dispuesta sobre, o bañada con, los anticuerpos unidos.

30 Adecuadamente, los anticuerpos presentan especificidad ligante hacia polipéptidos codificados por cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4. En una realización particular, los anticuerpos presentan una especificidad ligante hacia un polipéptido con una secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 5.

En otro ejemplo, un kit diagnóstico de ensayo del invento para la detección de astrovirus de tipo 3 del pollo en muestras de aves de las que se sospecha que están infectadas con el virus comprende una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4.

35 En ejemplos particulares, se proporciona una sonda de ácido nucleico capaz de hibridarse con cualquiera de las ID. SEC. números 1, 2 y 4.

En una realización, una sonda puede ser una secuencia de ácido nucleico, y la hibridación de dicha sonda con una secuencia de nucleótidos de la muestra puede ser detectada mediante hibridación por transferencia en forma de punto.

Adecuadamente, la sonda puede ser un conjunto de cebadores.

40 Cuando se usa un conjunto de cebadores, dicho conjunto de cebadores puede ser utilizado para multiplicar por medio de RT-PCR una secuencia seleccionada si está presente una secuencia de nucleótidos particular en la muestra.

En ejemplos particularmente preferidos, se puede seleccionar un conjunto de cebadores de:

Directo: 5' - AGC CTC AAA GTA TAA GAC GCA G-3', ID. SEC. nº 6

45 Inverso: 5' - CCA TGC TAT TTC AAA GGT GGT T-3', ID. SEC. nº 7.

Preferiblemente, el kit de ensayo es específico para el astrovirus de tipo 3 del pollo como ha sido depositado bajo el número de Acceso CNCM I-3541 en el CNCM, Instituto Pasteur, el 15 de diciembre de 2005.

Adecuadamente, el virus, las secuencias de nucleótidos, las secuencias polipeptídicas, los moduladores del sistema inmune, las vacunas y los kits del presente invento se pueden utilizar en relación con aves, más preferible las aves que se producen comercialmente, más preferiblemente aves de corral tales como pollos, pavos, patos, gansos, faisanes, palomas y pintadas, aún más preferiblemente pollos.

5 **Definiciones**

Como aquí se utiliza, el término "aislado" se refiere a la preparación in vitro, el aislamiento y/o la purificación de un péptido, polipéptido, proteína, anticuerpo, virus o molécula de ácido nucleico del invento, para que no estén asociados con sustancias in vivo o estén sustancialmente purificados de sustancias in vivo.

10 Como aquí se utiliza, el término "aerosol" incluye partículas líquidas o sólidas finamente divididas que se pueden crear utilizando un sistema presurizado, tal como un nebulizador.

Como aquí se usan, las expresiones "ácido nucleico" y "secuencia de nucleótidos" incluyen DNA, cDNA o RNA genómicos.

15 El invento aquí descrito será ahora ejemplificado con referencia a las siguientes figuras y ejemplos no restrictivos. Otras realizaciones de este invento resultarán evidentes a quienes tienen una experiencia normal en la técnica a la vista de esta descripción.

En la Figura 1 se muestra la comparación de la identidad de aminoácidos de ELVs y astrovirus aviares por parejas.

En la Figura 2 se muestra un análisis filogenético de secuencias de astrovirus humano, de pollo y de pavo.

20 En la Figura 3 se muestra la electroforesis, en gel de agarosa, de los resultados de RT-PCR obtenidos con muestras intestinales de polluelos de pocos días, en que el producto de RT-PCR es 187 pares de bases (bp; del inglés, base pairs)

**Infección de pollos jóvenes con CAstV-3**

Investigaciones de campo experimentales y preliminares sugieren que las infecciones con el CAstV-3 están asociadas con un retraso del crecimiento o una depresión del crecimiento en pollos jóvenes.

25 La depresión del crecimiento es una característica de estados morbosos que incluye un crecimiento retrasado por el que las aves jóvenes no crecen al ritmo esperado. Esto puede ser transitorio, durando unos días después de los cuales las aves afectadas crecerán normalmente y "alcanzarán" a sus compañeros de pollada no afectados. Alternativamente, las aves pueden permanecer relativamente pequeñas ("enanismo") y quedar rezagadas con respecto a sus compañeros de pollada no afectados. De esta manera, se podría describir que el conjunto de animales, como un todo, presenta un "crecimiento desigual".

30 Experimentalmente, se ha mostrado que la inoculación oral de astrovirus 3 de pollo en pollos de 1 día de edad exentos de patógenos específicos (SPF; del inglés, specific pathogen free) daba lugar a una depresión del crecimiento del 17% a lo largo de un periodo de 14 días. Se observaron cambios histológicos en el intestino, el riñón y el páncreas, lo que indicaba que este virus se replicaba en el intestino pero tenía además la capacidad para propagarse más allá del tracto intestinal. Se detectó antígeno vírico en una gran variedad de tejidos. Se sugiere que  
35 la observada depresión del crecimiento puede haber sido debida a los efectos combinados tanto en el intestino como en los otros órganos, por ejemplo, el páncreas.

40 Evidencia sobre el terreno implicó la investigación de muestras clínicas de grupos de animales que presentaban "crecimiento desigual", que mostró que los contenidos intestinales de algunos pollos clínicamente afectados contienen grandes cantidades de virus de tipo enterovirus (ELV), incluyendo CAstV-3, junto con rotavirus y reovirus. Se reconoce que el astrovirus de tipo 3 del pollo puede estar contribuyendo al problema clínico. Además, la infección oral de pollos SPF de 1 día de edad con un inóculo preparado a partir del contenido intestinal de un pollo enfermo de un grupo de animales que presentaba crecimiento desigual dio lugar a una depresión del crecimiento de aproximadamente 30% a las 5 semanas después de la infección. El examen serológico mostró que los pollos que  
45 habían recibido el inóculo se habían convertido en seropositivos para CAstV-3 y otro ELV inmunológicamente distinto previamente identificado. Este hallazgo indicaba que el inóculo contenía CAstV-3 y sugería que este virus podría haber estado contribuyendo al retraso del crecimiento.

50 Es probable que los efectos patógenos causados por infecciones con virus entéricos tales como CAstV-3 sean más graves en pollos más jóvenes y en pollos sin anticuerpos maternos hacia los virus infectivos. Se reconoce que puede que la presencia de anticuerpo materno no impida infecciones del tracto intestinal del pollo debido a la ausencia de anticuerpo en este sitio, pero dicha presencia puede impedir o reducir la propagación de la infección más allá del intestino.

### Infección de un embrión con CAstV-3

Se ha observado evidencia de transmisión embrionaria de CAstV-3 en un reciente trabajo de los inventores, que ha demostrado la presencia del virus en tejidos intestinales obtenidos de polluelos de un día de edad procedentes de diversos grupos de aves reproductoras. El examen serológico mostró que la mayoría de los grupos de aves reproductoras presentaban conversión parcial en seropositivos para astrovirus de tipo 3 del pollo cuando se examinaron a las 22 semanas (justo antes de comenzar a poner). Conjuntamente considerados, estos resultados sustentan la idea de que muchas aves reproductoras resultan infectadas durante la puesta y que, como consecuencia, son capaces de transmitir el CAstV-3 a sus embriones y sus polluelos descendientes.

La inoculación de productos de aislamiento de CAstV-3, incluyendo FP3, en embriones de 6 ó 7 días de edad causaba la muerte del embrión, enanismo y necrosis hepática y cutánea en embriones, y capacidad reducida para salir del cascarón. Por lo tanto, en el terreno, las infecciones con CAstV-3 tienen potencial para dañar al embrión en desarrollo y causar una capacidad reducida para salir del cascarón.

Independientemente de si el CAstV-3 causa problemas de salud al embrión, es probable que el virus verticalmente transmitido plantee una amenaza al polluelo recién salido del cascarón, particularmente porque estos polluelos no tendrán anticuerpo procedente de la madre hacia el virus. La replicación del virus puede causar efectos patógenos a estos polluelos directamente infectados. El virus excretado por estas aves, a menudo en los primeros días, infectará a su vez horizontalmente a los compañeros de pollada, que tendrán anticuerpo materno (si el huevo fue producido por un ave reproductora previamente infectada, positiva para el anticuerpo) o no tendrán anticuerpo materno (si el huevo fue producido por un ave reproductora no infectada, negativa para el anticuerpo). Es probable que el efecto protector del anticuerpo materno conduzca a una variación en los efectos patógenos observados y se pueda observar un crecimiento desigual en el conjunto de pollos tomateros.

### Aislamiento y caracterización preliminar del agente infeccioso

Usando el método de inoculación en embriones de polluelo, se realizaron diversos intentos exitosos para aislar agentes infecciosos de pollos débiles de 1 día de edad procedentes de grupos de aves que presentaban una capacidad reducida para salir del cascarón y mayores proporciones de polluelos débiles. Lo siguiente es uno de dichos ejemplos.

Polluelos débiles procedentes del envío "11672" de muestras fueron homogeneizados como polluelos enteros e inoculados en embriones de 7 días de edad a través del saco vitelino. No se registraron muertes de embriones después de 10 días de incubación pero los embriones eran más pequeños que los testigos. Se procesaron muestras de fluido alantoideo (AF; del inglés; allantoic fluid) de los huevos y se examinaron por microscopía electrónica (EM; del inglés, electron microscopy), pero no se vieron partículas víricas. Los hígados de estos embriones fueron reunidos, homogeneizados y vueltos a inocular por la vía del saco vitelino (1<sup>er</sup> pase) en huevos de 7 días de edad. Con estas muestras, se registraron muertes de embriones entre 9 y 12 días después de la inoculación. Los embriones estaban empequeñecidos en comparación con los testigos, y se vieron lesiones blancas (zonas de necrosis) alrededor de los márgenes de los lóbulos hepáticos. En estos huevos, el fluido alantoideo tenía un evidente color verde, y éste fue recogido y almacenado (-70 °C). El examen por EM no reveló evidencia alguna de partículas víricas.

Los hígados de los embriones muertos fueron extirpados, reunidos, homogeneizados y examinados por microscopía electrónica, pero no se vieron partículas víricas. Los hígados reunidos fueron vueltos a inocular en huevos de 7 días de edad (2<sup>o</sup> pase), y todos los embriones murieron con muertes registradas a partir del día 4 después de la inoculación. Los embriones estaban empequeñecidos y, como antes, el fluido alantoideo tenía un evidente color verde. Se extirparon los hígados y los riñones de los embriones muertos y se cortaron secciones con criostato. Las secciones hepáticas fueron teñidas para inmunofluorescencia por el virus de la bronquitis infecciosa, pero no se observó fluorescencia positiva. Las secciones criostáticas de hígado y riñón fueron conservadas para una tinción con antisueros adicionales en días posteriores. Se vieron lesiones necróticas blancas en los hígados de un grupo de muestras, y parte de este material fue procesado para EM de secciones delgadas, pero no se vio evidencia alguna de replicación vírica. Los hígados con lesiones necróticas fueron homogeneizados y proporcionados a células hepáticas embrionarias primarias de polluelo en 2 pases de 7 días. No se observó efecto citopático (CPE; del inglés, cytopathic effect) viral, pero los cubreobjetos fueron fijados y fueron almacenados a -20 °C para realizar una tinción fluorescente cuando se dispusiera de un producto de conjugación.

El material del 2<sup>o</sup> pase fue sometido a un pase adicional en embriones de polluelo del modo esbozado a continuación. Los productos de homogeneización hepática reunidos fueron inoculados de nuevo por el saco vitelino, esta vez en embriones SPF de 7 días de edad (3<sup>er</sup> pase). Se registraron muertes de embriones del día 7 al 11 después de la inoculación, y los embriones presentaban crecimiento retrasado con gruesas lesiones necróticas en el hígado y la piel. Se fijaron muestras de hígado afectado y se almacenaron para un examen histopatológico, y los restantes hígados de los embriones muertos fueron reunidos y homogeneizados. Se recogieron separadamente

fluidos alantoideos y también se reunieron. El fluido alantoideo fue inoculado (4º pase) mediante inoculación en el saco vitelino de embriones de 7 días de edad, lo que dio lugar a muertes de embriones entre 7 y 10 días después de la inoculación. Se reunieron fluidos alantoideos e hígados y se utilizaron para infectar embriones SPF de 7 días de edad (5º pase). Los embriones fueron recogidos, homogeneizados y almacenados a -70 °C. A este producto de homogeneización se hace aquí referencia como Producto de Homogeneización de Embriones del 1º pase del virus 11672 (1p EH; del inglés, 1st pass Embryo Homogenate).

Se emprendieron estudios de concentración y purificación con los productos de homogeneización procedentes del pase de las muestras 11672 en embriones.

El producto de homogeneización de embriones completos fue preparado después de inocular 11672 (1p EH) en los embriones, en un intento de identificar el agente responsable de la mortalidad de los embriones. Se realizó la inoculación en doce huevos SPF VALO de 7 días de edad y, después de 7 días de incubación, se recolectaron embriones enanos y AF verde. Para la purificación se utilizaron diferentes materiales de partida. Estos fueron fluido alantoideo, tallos vitelinos, hígados verdes y embriones completos. En cada caso se utilizó una purificación similar. Ésta implicaba 3 operaciones: (1) clarificación a 3000 rpm durante 20 minutos, (2) ultracentrifugación de baja velocidad a 10.000 rpm durante 30 minutos, y (3) ultracentrifugación de alta velocidad a 30.000 rpm durante 3-4 horas. Las centrifugaciones a 10.000 rpm y 30.000 rpm se llevaron a cabo en una ultracentrífuga Beckman (rotor Tipo 35 de ángulo fijo).

Con las preparaciones de hígados y embriones completos, se utilizó una operación adicional. Ésta implicaba resuspensión del sedimento de centrifugación a alta velocidad, tratamiento o no tratamiento de la suspensión con el detergente dodecilsulfato sódico (SDS; del inglés, sodium dodecyl sulphate) y sedimentación a través de lechos de sacarosa al 25% utilizando una centrifugación a 32.000 rpm, durante 3-4 horas, con un rotor Beckman oscilante de 6 x 14 ml. Se incluyó esta operación porque los sedimentos de centrifugación a alta velocidad eran espesos y gelatinosos y probablemente contenían niveles elevados de contaminación de origen embrionario que harían muy difícil la visualización de partículas víricas. Todas las muestras de material obtenidas de las preparaciones anteriores resultaron negativas por EM de contraste negativo y por EM inmune usando antisuero de convaleciente.

Para definir mejor si la infectividad se concentraba en una o más fases del proceso de purificación, un producto de homogeneización de embriones completos con crecimiento retrasado, del material del pase 1p EH, fue tratado usando las operaciones 1, 2 y 3 anteriores, recogiendo material después de cada operación de centrifugación para su inoculación en embriones SPF de 7 días de edad. Todas las preparaciones produjeron enanismo o muerte durante la incubación de 7 días, lo que indicaba que la infectividad estaba presente en todas las fases del proceso de purificación, incluyendo el sedimento de centrifugación a alta velocidad. Este resultado indicaba que algo de virus infeccioso permanecía en asociación con material celular ya que se recogía infectividad como sedimento mediante la operación de centrifugación a 10.000 rpm (Tabla 1). Algo de virus infeccioso permanecía en la fracción sobrenadante soluble a 10.000 rpm y era recogido como sedimento en la centrifugación a 30.000 rpm. La detección de cierta infectividad en el sobrenadante a 30.000 rpm sugería que el virus 11672 puede ser pequeño. Sin embargo, usar la inoculación en embriones para mostrar de este modo la infectividad del virus es un método relativamente tosco. Sin titular la infectividad del virus es difícil evaluar qué proporciones de infectividad estaban presentes en cada fracción.

Tabla 1: Patrón de muertes de embriones después de la inoculación de fracciones procedentes de una centrifugación diferencial

Tratamiento	Días después de la inoculación							Hallazgos con embriones vivos el día 12
	3	4	5	6	7	10	11	
Sobrenadante a 10.000 rpm		1	1	1	2	5		0
Sedimento a 10.000 rpm (1:60)			2	1	2	3		2 muy pequeños (1 con necrosis hepática)
Sobrenadante a 30.000 rpm					1	2	1	3 embriones pequeños 2 necrosis hepáticas



Tratamiento	Días después de la inoculación							Hallazgos con embriones vivos el día 12
	3	4	5	6	7	10	11	
								2 hígados agrandados
Sedimento a 30.000 rpm (1:60)	1		1	1		4	1	2 normales

Se inoculó cada fracción en 10 huevos.

Las fracciones de sedimentación fueron diluidas 1:60 para considerar el efecto de la concentración.

Los embriones que quedaban vivos el día 12 después de la inoculación fueron sacrificados y examinados.

- 5 Para determinar si el agente infeccioso era sensible al cloroformo, es decir, si el agente vírico tenía envoltura (sensible al tratamiento con cloroformo) o no tenía envoltura (resistente al cloroformo), se trató el producto de homogeneización de embriones con virus 11672 (2p eH) con cloroformo y luego se inoculó en embriones de 7 días de edad. Se registraron muerte de embriones y crecimiento retrasado tanto en las preparaciones tratadas como en las no tratadas, lo que indicaba que el agente infeccioso no tenía envoltura.
- 10 Se diluyó el producto de homogeneización de embriones con virus 11672 (2p EH) de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$  y se inoculó cada dilución en embriones de 7 días de edad. Se registraron crecimiento retrasado y muertes de embriones con hasta la dilución  $10^{-4}$  (Tabla 2). Como se esperaba, los efectos más intensos sobre los embriones, en términos de número de muertes prematuras y enanismo, se dieron con la mayor concentración de virus (es decir, neto y en diluciones  $10^{-1}$ ). Hubo pocas muertes con las diluciones  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  y ninguna con la dilución  $10^{-4}$ . Cambios tales como enanismo y necrosis hepática en los embriones aún vivos el día 11 después de la inoculación indicaban que aún estaba presente virus infeccioso en estas diluciones. Un título de infectividad estimado de  $10^4$  dosis infecciosas de embriones proporciona una explicación del hasta ahora fracaso a la hora de ver partículas víricas por EM, ya que a menudo se afirma que se requiere un título de partículas víricas  $> 10^5$  o incluso  $> 10^6$  para ver partículas por EM.
- 15

Tabla 2: Patrón de muertes de embriones después de la inoculación de diferentes dosis infecciosas de virus 11672

Dilución del inóculo	Días después de la inoculación							Hallazgos con embriones vivos el día 11
	3	4	5	6	7	10	11	
Sin diluir			1	2	1	3		1 pequeño
-1	1		1		1	5		
-2					1	1		Los 6 muy pequeños 4 necrosis hepáticas
-3					1	1		Los 6 pequeños 2 necrosis hepáticas
-4								4 normales 4 pequeños, necrosis hepática
-5								Todos normales

20

Se inoculó cada dilución en 8 huevos.

Todos los huevos muertos el día 7 presentaban crecimiento retrasado, hemorragias y necrosis hepática.

Los embriones que quedaban el día 11 fueron sacrificados y examinados.

5 En un experimento adicional se investigó el efecto de la infección de embriones con el virus 11672 sobre la capacidad para salir del cascarón. Se inoculó el producto de homogeneización de embriones con virus 11672 (2p EH) en embriones de 7 días de edad, en 3 diluciones ( $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$ ), con 30 embriones para cada dilución. Se dejaron 24 embriones sin inoculación como testigos. Se examinaron todos los embriones que murieron a partir del día 8 después de la inoculación. Todos eran muy pequeños en comparación con los testigos, con evidencia de formación de hemorragias y necrosis del hígado. Además, el día 12 después de la inoculación se abrieron 8 huevos de cada dilución y se examinaron los embriones, con los resultados siguientes:

10 Dilución  $10^{-3}$ : 4/8 embriones eran pequeños en comparación con los testigos, 3/8 presentaban un crecimiento muy retrasado, con obvia necrosis del hígado, y 1/8 era normal.

Dilución  $10^{-4}$ : 3/8 presentaban un crecimiento muy retrasado, 2 de estos con necrosis hepática, y 5/8 eran normales.

Dilución  $10^{-5}$ : 8/8 normales.

Los huevos que sobrevivían el día 13 después de la inoculación fueron transferidos a una incubadora y dejados eclosionar.

15 Tabla 3: Efecto del título del virus 11672 sobre la capacidad para salir del cascarón

Dilución del inóculo	Nº de huevos incubados a los 13 días después de la inoculación	Muertes antes del día 13	Nº de pollos salidos del cascarón	Muerte en el cascarón	% de pollos salidos del cascarón
Testigo (sin inoculación)	15	1	11	4	73%
$10^{-3}$	11	11	3	8	27%
$10^{-4}$	15	7	5	10	33%
$10^{-5}$	17	5	5	12	29%

Todos los pollos que salieron del cascarón estaban muy débiles, y les llevó mucho tiempo salir del huevo.

20 En todas las inoculaciones en embriones se había utilizado hasta ahora la vía de inoculación del saco vitelino, y las muertes y el crecimiento retrasado de embriones había sido un hallazgo consistente. La vía de inoculación de la membrana corioalantoidea (CAM; del inglés, chorioallantoic membrane) ha resultado exitosa en ciertos estudios víricos ya que, si el agente se desarrolla en la CAM o se puede adaptar al desarrollo en la CAM, se puede originar una mayor concentración de virus, lo que hace más sencilla la identificación. Además, en el pasado, se han utilizado secciones criostáticas de CAM infectada para estudios serológicos usando inmunofluorescencia indirecta. Además, las CAMs de huevos infectados se recogen normalmente a los 4 días después de la inoculación, lo que acorta el procedimiento de aislamiento (hasta 12 días siguiendo la inoculación en el saco vitelino). Por lo tanto, se inoculó el virus 11672 (1p EH) en las CAMs de embriones de 9 días de edad, y se recogieron éstas 4 días más tarde. Se observaron focos blancos y cierto engrosamiento de la CAM, lo que indicaba crecimiento vírico. Se congelaron las zonas engrosadas de la CAM y se cortaron secciones criostáticas para tinción inmunofluorescente. Las zonas afectadas fueron escindidas, homogeneizadas y vueltas a inocular en las CAMs de embriones de 9 días de edad. De nuevo, resultó evidente el engrosamiento de las CAMs que habían recibido el inóculo. El material ha sido sometido ahora a cuatro pases mediante inoculación en CAM. No se observó virus alguno cuando se examinaron las preparaciones de CAM por EM, lo que sugiere que las producciones víricas eran pequeñas.

#### Caracterización antigénica del agente infeccioso

35 Se inocularon oral e intramuscularmente 0,1 ml del producto de homogeneización de embriones completos de virus 11672 en 12 polluelos SPF de 1 día de edad en un aislador de barrera. Las aves fueron sometidas a una estimulación de refuerzo con una segunda inoculación oral a la 6 semanas de edad y fueron luego sometidas a sangría y sacrificadas 2 semanas más tarde. Durante todo este período no se vieron signos clínicos obvios en las aves que habían sido sometidas a inoculación. El suero de las aves fue recogido, reunido y almacenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Antisuero 1). Un segundo grupo de aves de 1 día fue sometido a inoculación intramuscular y fue sangrado después

de 5 semanas. El suero fue recogido, reunido y almacenado a -20 °C como antes (Antisuero 2).

5 Se inoculó el producto de homogeneización de embriones con virus 11672 (2p EH) en cultivos celulares de hígado de embrión de polluelo (CEL; del inglés, *chick embryo liver*) SPF en matraces de plástico de 25 cm<sup>2</sup>. No se observó efecto citopático (CPE) alguno de tipo viral después de 7 días de incubación, momento en que las células fueron separadas del matraz por raspado, resuspendidas y vueltas a inocular en cultivos frescos (segundo pase). No se observó CPE alguno después del segundo pase ni después de un tercer pase en cultivos de CEL como antes.

10 Se inoculó el producto de homogeneización de embriones con virus 11672 (2p EH), sin diluir y en una dilución 1/10, en cultivos celulares de hígado de embrión de polluelo (CEL) SPF que crecían en cubreobjetos circulares de 13 mm, y se incubaron los cultivos a 30 °C durante 48 horas. Los cubreobjetos fueron luego fijados en acetona durante 10 minutos, dejados secar al aire y teñidos con el Antisuero 1 (anterior) durante 1 hora a 37 °C. Después de un lavado con varios cambios de PBS, los cubreobjetos fueron teñidos de nuevo con un producto de conjugación de FITC-anticuerpo anti-pollo durante 1 hora, lavados, montados en glicerol tamponado y examinados bajo iluminación ultravioleta. Se observó inmunofluorescencia positiva en células individuales con ambas diluciones del inóculo. La inmunofluorescencia era citoplásmica, y a menudo de naturaleza granular. Este resultado mostraba que el virus hecho pasar a través de embriones era capaz de experimentar replicación parcial en células de CEL pero que la replicación no daba lugar a CPE.

20 La inmunofluorescencia indirecta (IIF), llevada a cabo con el Antisuero 1, también resultó exitosa a la hora de detectar antígeno vírico en secciones criostáticas de riñones embrionarios y la CAM de huevos infectados con el virus 11672. Esto confirmó que el engrosamiento/pústulas detectados en las CAMs estaban asociados con el virus e identificaban además un posible sitio (es decir, el riñón) de replicación del virus en los embriones de polluelo que habían sido sometidos a inoculación experimental.

25 El examen exploratorio por IIF mostró que el Antisuero 1 teñía los cultivos de CEL, en cubreobjetos, que habían sido infectados con el virus FP3, un virus de tipo enterovirus (ELV) que fue aislado de polluelos muertos en el caparazón en los años 1980. Además, se mostró por IIF que el antisuero generado hacia FP3 en una investigación previa [McNulty et al. (1990), *Avian Pathology* 19: 75-87] reaccionaba con cultivos de CEL, en cubreobjetos, infectados con el virus 11672. No se han llevado aún a cabo ensayos de neutralización cruzada.

Basándose en los resultados de la IIF, se concluyó que el virus 11672 es un virus de tipo enterovirus (ELV) que está antigénicamente relacionado con el virus FP3. Aunque el ensayo de IIF permite detectar virus que comparten un antígeno de grupo común, no permite distinguir virus de diferentes serotipos.

30 **Caracterización de la secuencia de nucleótidos del virus 11672 como nuevo astrovirus de pollo**

Estudios sobre la secuencia de nucleótidos del producto de aislamiento 11672

Se obtuvieron las siguientes secuencias cebadoras para permitir la multiplicación de la secuencia del gen de la RNA polimerasa de astrovirus por RT-PCR.

AstPol-1F

35 5'-GAYTGGACNMGNTAYGAYGGNACNATNCC – ID. SEC. nº 8

AstPol-1R

5'-YTTNACCCACATNCCRAA – ID. SEC. nº 9

en que Y = C o T; M = A o C; R = A o G; y N = desoxiinosina (I).

Se llevó a cabo una RT-PCR en un paso usando glóbulos Ready-To-Go para RT-PCR, de Amersham Pharmacia.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
42 °C	30 minutos	1
94 °C	5 minutos	1
94 °C	60 segundos	45
45 °C	60 segundos	
72 °C	90 segundos	

## ES 2 387 580 T3

Temperatura	Tiempo	Ciclos
72 °C	5 minutos	1

Cebador directo	Cebador inverso	Tamaño
AstPol-1F	AstPol-1R	~ 411 bp

5 La ID. SEC. nº 1 y la ID. SEC. nº 2 son las secuencias de nucleótidos (nt) que son específicas del astrovirus de tipo 3 del pollo (CAstV-3) (producto de aislamiento 11672). Estos son los 391 nt que están flanqueados por los cebadores degenerados destinados a multiplicar secuencias de astrovirus en la región del gen de la RNA polimerasa. Se muestran las secuencias de 2 clones. Estos difieren en cuatro posiciones de nt (identidad de nt de 99,0%).

También se muestra la secuencia de nt de la correspondiente región del clon 1 del producto de aislamiento FP3, como ID. SEC. nº 3. Ésta difiere del clon 1 del virus 11672 en 20 posiciones de nt (identidad de nt de 94,9%).

10 Búsquedas con Blast indican que la región de 391 nt comparte una identidad de nt de 65% con el astrovirus de tipo 1 del pavo (número de Acceso de GenBank: Y15936), una identidad de nt de 61% con el virus de la nefritis aviar (número de Acceso de GenBank: AB033998) y una identidad de nt de 60% con el astrovirus humano de tipo 1 (número de Acceso de GenBank: Z25771).

ID. SEC. números 1, 2 y 3 de 11672 y FP3, anteriormente referidas

15 ID. SEC. nº 1

Clon 1 de 11672

```
AAAGCCCTTGTTTTGGCGCATTAGGCAGATTCGGTTTTTTTTTTTAGC
CTCAAAGTATAAGACGCAGGAAAACAAGGAGCTGTTTGATTGGTACA
CCAAAAACCTTTTGGAGAAGGTGATATTGTTACCTACTGGGGAAGTGT
GCCAAATAAAGCGAGGAAATCCTTCAGGGCAATTTTCTACCACCGTG
GATAACAACATGTGCAACGTATGGTTAACCACCTTTGAAATAGCATGG
CTCCACCGCAAACAACGGGGCAGACTACCAACCCAGCTGAATTGC
GTGAAAACGTTTGTTATATTTGCTACGGTGATGACAGGCTCTTATCAG
TTTCGAGAGACTTTGTCATTTATGAGCCTGAAACTGTGGTAGCAATGT
ACGCAGATGTA
```

ID. SEC. nº 2

Clon 2 de 11672

20 AAAACCCTTGTTTTGGCGCATTAGGCAGATTCGGTTTTTCTTTTAGC  
CTCAAAGTATAAGACGCAGGAAAACAAGGAGCTGTTTGATTGGTACA  
CCAAAAACCTTTTGGAGAAGGTGATATTGTTACCTACTGGGGAAGTGT

GCCAAATAAAGCGAGGAAATCCTTCAGGGCAACTTTCTACCACCGTG  
 GATAACAACATGTGCAACGTATGGTTAACCACCTTTGAAATAGCATGG  
 CTCCACCGCAAACAACGGGGCAGACTACCAACCCAGCTGAATTGC  
 GTGAAAACGTTTGTATATTTGCTACGGTGATGACAGGCCCTTATCAG  
 TTTTCGAGAGACTTTGTCAATTTATGAGCCTGAAACTGTGGTAGCAATGT  
 ACGCAGATGTA

ID. SEC. nº 3

Clon 1 de FP3

AAAGCCCTTGTTTTGGCGTATTAGGCAGATTCGGTTTTTCTTCTTAGC  
 CTCAAAGTATAAGACGCAGGAAAACAAGGACCTCTTTGATTGGTACA  
 CCAAAAACCTCTTGGAGAAGGTGATATTGTTACCTACTGGAGAAGTGT  
 GCCAAATAAAGCGAGGGAATCCTTCAGGGCAATTTTCTACTACCGTG  
 GATAACAACATGTGCAATGTATGGCTAACCACCTTTGAAATAGCATGG  
 CTTACCGCAAACAACGGGGTAGATTACCAACCCAGCTGAATTGCG  
 TGAAAATGTTTGTATATTTGCTACGGTGATGATAGGCTCTTATCAGTT  
 TCAAGAGACTTTGTCAATTTATGAGCCTGACACTGTGGTAGCGATGTAC  
 GCTGATGTA

- 5 Estos datos de secuencias muestran que el virus 11672 y el virus FP3 están muy íntimamente relacionados a nivel de secuencia de nucleótidos y que es probable que ambos sean productos de aislamiento de la misma especie viral. Estos datos de secuencias son consistentes con el hallazgo de que el virus 11672 y el FP3 son antigénicamente similares, como se demostró por inmunofluorescencia indirecta. Basándose en los niveles de identidad nucleotídica compartida con otras especies de astrovirus, se considera que la especie vírica de la que 11672 y FP3 son productos de aislamiento es un nuevo astrovirus de pollo, al que los inventores han denominado astrovirus de tipo 3 del pollo (CAstV-3).

15 Se produjo la secuencia de nucleótidos correspondiente al fragmento de 3,2 kb del extremo 3' del genoma del virus, por RT-PCR usando un cebador directo basado en oligo-dT que se une al tramo de poliA del extremo 3' del genoma del astrovirus, y un cebador inverso seleccionado de la secuencia del fragmento de 391 nucleótidos multiplicado mediante la estrategia del cebador degenerado (ID. SEC. números 1-3). El fragmento de 3,2 kb fue clonado usando el vector pTOPO y fue secuenciado usando una estrategia de "desplazamiento de cebadores" ("primer walking") que se inicia con los cebadores directo e inverso de M13, que son específicos para el vector plasmídico. Combinando la secuencia de nucleótidos específica para el fragmento de 391 nucleótidos del virus 11672 con la determinada para el fragmento de 3,2 kb se obtiene una secuencia total de 3265 nucleótidos. Esta secuencia abarca 730 nucleótidos del extremo 5' del ORF 1b de astrovirus, que codifican la RNA polimerasa de astrovirus dependiente de RNA, una pequeña secuencia intergénica de 24 nucleótidos, el ORF 2 completo de astrovirus (2217 nucleótidos), que codifica la región proteica de la cápsida, y la región no traducida (UTR; del inglés, untranslated region) 3' de 276 nucleótidos (excluyendo la cola de poliA).

La secuencia de nucleótidos del fragmento de 3265 nucleótidos es la siguiente:

25 ID. SEC. nº 4

AAAGCCCTTGTTTTGGCGCATTAGGCAGATTCGGTTTTTTTTTTTAGC  
CTCAAAGTATAAGACGCAGGAAAACAAGGAGCTGTTTGATTGGTACA  
CCAAAACCTTTTGGAGAAGGTGATATTGTTACCTACTGGGGAAGTGT  
GCCAAATAAAGCGAGGAAATCCTTCAGGGCAATTTTCTACCACCGTG  
GATAACAACATGTGCAACGTATGGTTAACCACCTTTGAAATAGCATGG  
CTCCACCGCAAACAACGGGGCAGACTACCAACCCCAGCTGAATTGC  
GTGAAAACGTTTGTATATTTGCTACGGTGATGACAGGCTCTTATCAG  
TTTCGAGAGACTTTGTCTTTTATGAGCCTGAAACTGTGGTAGCAATGT  
ACGCAGATGTATTCGGCATGTGGGTGAAGCCAGAGAATGTGAAGGTA  
AGAAATACACTTAGTGGTCTCTCTTTCTGTGGTATGACAATTACAAA  
AATCAGCATGGCCGTTATGTTGGTATTCCTAATGTCAATAAAATACTG

TCCACTCTACGGTCTCCTACAAAGCGCCTTCCAAATGTAGAAGCACTA  
TGGGGTAAGTTGATATCATTAAAGAATTCTGTGTGAGAATGCAGATCCC  
GACGTAAAGGATTACTTAGATAGGCAGATCAATTGCGTTCGAGGAGTA  
TGCCGCTGCTGAAGAAATACAGTTACCAGAAGTCGGGCCCGACTTCT  
TTCAGAAAATCTGGTAGAGGGATGGACCGAAATATAGCAGCATGGCC  
GATAAGGCTAGCGCGCAGAAGGAGAAAACAACAAGGCGCGGACGTG  
GCCGTTCTCGATCTAGGTCACGTTCTCGTTCCCGTTCTAGGAATCGT  
GTCAAGAAAATCTCACGATAGTTGAATCTAAGAAAACCCCATCTAGA  
TCTATATTAAGAAAAGAACTTGAAAATCATGAGAGAAGGGATAGGAGG  
CGTTTTAGGAAGATTGAAAAAAATTAATGGCCCTAAAATACATGAT  
CGCATGGCAGTCACAACACTACACTTGGAGTCCTCACTGGAAATTCTGA  
CAATAATTTGAAAGGAAAATGAGAGCTCTTCTTAACCCATTGCTTTT  
GAAATCTCAAACACTGGGGCCTCAGCATCCCCACTTTCCCTTAGGG  
CATCTCAGTATTCAATGTGGAAGATACAGAAATGTGTTGTAAAATTTG  
TTCCCTAGTTGGGGCTGCTAATGTGGCAGGTAGTGTATCCTTTGTG  
TCTCTGGATCAGGATGCAACCTCCTCCCAGCCTGAATCACCTGATAC  
GATAAAGGCAAAGGTGCATGCAGAAGTTGCAATTGGACAAAGATTTA  
ATTGGAACGTTCAATCTAGATACCTGGTCGGACCCCGTTCTGGTTGG  
TGGGGCATGGATACTGGTGAGTCACCAACTGATACAGTTGGACCAGC  
CCTTGACTTTTGAATCTTTATAGAACAGTGAACACACTTCAAACCTGG  
CTCAACATCGCAGGCATACACTGCACCATTGTTTTCTATTGAAGTGTA  
TACGGTGTATGTTTTTTCAGGTTACGAACCAAAGCCTGCCCTGGCGA  
CCATGACAAATTCAACTTTTGAGAGTCAGCAGGGGGTGACCATAACA  
AATGGTGCTAATGGTGAACCTTCTGCTCAATGTTCCACGGCGATCGAG  
TCTTGCCGAAGGGCTGCGTGAAAAGGAAGTATTATACCGCGGCCAAA  
ACCAAACGGGTGGTGTGGTGAGGTAAGTACTGTGGGCGGTGGCATCAGG  
AGCTGTTGAAGGAGCTGCAGAAGCGTTGGGCCCATGGGGATGGTTA  
CTGAGAGGTGGCTGGTGGGTGATAAAGAAGTTGTTTGGACGGAGCG  
CTGAAAATGAAAGTGACGATTATGTGATGTAAGTCTATTGAGGATG  
CCAACAAGATAGTAGGATCTATCAAACGGTATCCAGTGCGGTCCCT

GTTCAACAAGGTCCTCTGGTTCTCACCCAAATCTCATCCCCAAATGTT  
AATCAAGCTGGGGGTGTTGTGCAGGTAGGTACAACAATTGCCACTGA  
TACTTGCCACTATCTCAGGCCAGGTTCCGCTTTTAGAGAACATTCT  
TACTCCAGCACTGGGCAGCCTGTGACATCAACTAAGAGCCATACTA  
TGAGGATCACTGGGTTTCCAGCCTCGAAATTGGTAACATCAACGTGC  
TCGCAATGGTTGGGCACTACTGATACGAGTGTCCAAGCAACAAAGTG  
GCTAATGTCGGATTATACAGACACTGGAGTGATATTTGGCTTTCCATA  
CTCTGATGATTCCCCCGGGGAAACTTTTGGTAACATTGGAGTAATACA  
CACAGCCAAGTCGCTCATAAAAACGGTCACATCAAGGCGACAACGCG  
GGCTACGCATGTCTCCACTTGTTTCGACATTGTTACCATCAACTTCTA  
AGGGACCAACCCAGATGCTTAGTTGCTTTGACACGCCTTACTATTGG  
ATTAGGGTTTGTGACAATACCTGCTCAAACAAACCCACAAATGGCGC  
CGTGACACAGCGCTGCAATGCTTGGGGCGTTATGGTGGTGAGCTTA  
GCACACAATAAAGTCTACATCTTGGCTGGTTATCCCGATTCTCAA  
AGGGTACCACAACAACA  
ACTAGTCTGGGACACTTTT  
GACTGGGATGC  
TACATTTTCTACTGGCAGGATTTATAATACAACATGGCCAGGACTTTA  
TGAAGAAAGTGATGATGAAACAGATGCCGAATCTGACATCTCCAGTC  
TTTTTGACCCCGTTAATGAGGTTGAGCAGGACTTTCACCTCAAATGTA  
GTCTGAAGACATCTGACTACTTGAAGGAGGAGGCTGATTATTGGAAA  
GCAAAAGCACACA  
CAATTGCTTATGGAGAAAGCAATGGGAAAAAATAAT  
GACTCTCCTCCACTTGTCGCTTTGAGAAGGGCGGACCTGAGCAGCA  
AAAACAGCCTGCTAGCAGCCGCGGCCACGCCGAGTAGGATCGAGGG  
TACAGCTGCACCTTCTTCATGGAGTTTTTATGCCATAATCAGGCTTTT  
CTCCATGTAAATCAAGGCACCGGGGCCACGCCGAGCAGGAACGAGG  
GTACAGTGCCGGGTTGACCCACCTGAAAGGGGCGTCCGCCGGTGT  
GATAATCACCACACCGGGGCTGGTTTAAATCACAGATAATCACTCT  
GTGTGTCAATCAGGTCTTTCGGGCGGTTTTGGAAACACTAGTTTTTAA  
AACCAATTTGATTTTGAATTAGATTAATTGGCAAAAAAAAAAAAAAAAAA

A.

El gen de la proteína de la cápsida tiene una longitud de 2217 nucleótidos y codifica una región proteica de 738 aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de la región proteica de la cápsida, de 738 aminoácidos, es la siguiente:

5 ID. SEC. nº 5



madkasaqkektrrgrgrsrsrsrsrnrvkktviveskktprsrilrkelenherrrrrkiekkl  
 gpkihdrnavttllgvtlgnsdnlnlerkmrallnplllksqntgasaspislrasmwkiqkcvvkvpl  
 vgaanvagsvsfvslqdatssqpespdtikakvhaevaigqrfnwnvqsrylvgprsgwwgmdtg  
 esptdvtgpaldfnlryrtvntlqtgstsqaytaplfsievtyvyvfygyepkpalatmntstfesqqgvtit  
 ngangellnvprsslaeglrkevlyrgqngtggvgevlwavasgavegaaealgpwggwllrggw  
 wviklfrsaenesddyvmyssiedankdsriyqtvssavpvqqgplvltqisspvnqaggvvqv  
 gttiatdylpisqaqvpllenilysstgqpvstkshtmrigtfpasklvtstssqwlgttdtsvqatkwlmsd  
 ytdgtvifgfpysddspgetfgnigvihtaksliktvtsrrqrglmsplvstllpstskgptqmlscfdtpyy  
 wirvcdntcsnkptngavtqrcnawgvmvslahnkvilagyypdsqtrvpqqqlvwdtdfdwdatfst  
 griynttwpglyeesddetdaesdislfdpvneveqdfhfkcslksdylkeeadywkakaqqllme  
 kamgknndspplvrfekggpeqqkqpassrghae

El conocimiento de la secuencia de nucleótidos y la prevista secuencia de aminoácidos de la región proteica de la cápsida puede ser explotado con diversos fines, incluyendo:

- 5 1) Uso como una vacuna de DNA, si el gen es clonado en un vector de expresión adecuado. Dichos vectores de expresión pueden ser también usados para cebar/inmunizar ratones para la generación de reactivos de anticuerpo.
- 10 2) Uso para producir productos proteicos recombinantes por sistemas de expresión procarióticos (por ejemplo, *E. coli*) y eucarióticos (por ejemplo, levaduras y células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes). Dichas proteínas pueden ser de utilidad como vacunas de subunidades o para inmunizar ratones para la generación de reactivos de anticuerpo.
- 3) Uso para generar péptidos específicos de la proteína de la cápsida, para inmunización o con fines de vacunación.
- 4) Uso de secuencias nucleotídicas específicas para el desarrollo de ensayos específicos de astrovirus 3 por RT-PCR.

15 **Diagnóstico serológico del astrovirus de tipo 3 del pollo en grupos de aves reproductoras**

Muestras de suero de grupos de aves reproductoras de aproximadamente 22 semanas de edad (justo antes de poner huevos) fueron examinadas en cuanto a la presencia de anticuerpo hacia el virus 11672, un producto de aislamiento de CAstV-3, mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta utilizando cultivos de CEL, en cubreobjetos, que habían sido infectados con el virus 11672. Se exploraron los sueros en una dilución 1:500 en PBS y se detectaron anticuerpos de pollo utilizando un producto de conjugación de anti-Ig de pollo-FITC. Se detectó anticuerpo en 62/211 (29,4%) aves y en muestras de 13/17 grupos de aves (76,5%). Los niveles relativamente bajos de seroconversión en ciertos grupos de aves sugería que ciertos grupos de aves estaban experimentando infecciones continuas en el momento de poner huevos (22 semanas) y que era probable que se produjeran más infecciones de aves reproductoras cuando éstas estuvieran poniendo huevos.

25 Tabla 4. Resultados serológicos de grupos de aves reproductoras examinadas a las 22 semanas de edad. Se utilizaron cubreobjetos de CEL infectados con el virus 11672, en un ensayo de inmunofluorescencia indirecta para detectar anticuerpo víricamente específico en sueros de pollo

Nº	Grupo	Alojamiento	Edad	Resultado	Nº	Grupo	Alojamiento	Edad	Resultado
1	A	1	22	11/20	10	I	1	22	2/10
2	A	2	22	6/10	11	J	1	22	4/9
3	B	1	22	7/30	12	K	1	22	0/22

Nº	Grupo	Alojamiento	Edad	Resultado	Nº	Grupo	Alojamiento	Edad	Resultado
4	C		22	3/10	13	L	1	22	4/10
5	D	1	22	9/10	14	M	1	22	3/10
6	E	1	22	0/10	15	N	1	22	2/10
7	F	1	22	0/10	16	O	1	22	0/10
8	G	1	22	1/10	17	O	2	22	6/10
9	H	1	22	4/10					

**Detección de astrovirus de tipo 3 del pollo en grupos de aves que presentan crecimiento desigual**

5 Se investigaron los contenidos intestinales de pollos enfermos procedentes de grupos que presentaban "crecimiento desigual", en cuanto a la presencia de virus. Esto implicaba preparar productos de homogeneización al 5-10% en medio MEM para cultivo celular, clarificación a 3000 rpm durante 30 minutos, centrifugación a 10.000 rpm, durante 30 minutos, del extracto clarificado, y ultracentrifugación del sobrenadante a través de un lecho de sacarosa al 30% (peso/peso) en PBS. Se inocularon muestras del sobrenadante a 10.000 rpm y del sedimento en sacarosa resuspendido, en células de CEL desarrolladas en cubreobjetos de vidrio. Después del lavado, los cultivos en cubreobjetos fueron incubados durante 48 horas y fueron luego fijados mediante tratamiento con acetona. Los cubreobjetos fijados fueron incubados con antisueros contra 3 ELVs inmunológicamente diferentes, incluyendo CAstV-3. Se detectó la presencia de CAstV-3 infeccioso en muestras de 1 grupo de pollos tomateros que presentaban crecimiento desigual, los días 5, 7 y 9 después de salir del cascarón. También se demostró la presencia de otros 2 ELVs inmunológicamente diferentes, a saber, el virus de la nefritis aviar (CAstV-1) y un ELV, ejemplificado por el producto de aislamiento "612". La microscopía electrónica por contraste negativo llevada a cabo con preparaciones crudas y parcialmente purificadas de contenidos intestinales mostró que dichas muestras contenían niveles elevados de ELVs y rotavirus.

10 Se utilizó un inóculo preparado a partir del contenido intestinal de un pollo enfermo procedente de un grupo que presentaba crecimiento desigual, para infectar oralmente a pollos SPF de 1 día de edad. Estas aves presentaban anomalías en el plumaje a aproximadamente las 2-3 semanas y una depresión del peso del 30% a las 5 semanas de edad. El examen por microscopía electrónica de muestras de contenido intestinal obtenidas de aves sacrificadas los días 4, 6, 8, 10 y 15 reveló la presencia de ELVs en todos esos momentos. Se mostró por IF indirecta que el antisuero recuperado de aves a las 5 semanas de edad contenía anticuerpos hacia CAstV-3 y hacia un segundo ELV diferente. Este experimento mostró que el contenido intestinal del pollo enfermo utilizado para la inoculación contenía CAstV-3 y sugirió que este ELV podía haber estado contribuyendo a la depresión del crecimiento.

**Vacunación**

20 Es probable que una vacuna para CAstV-3 proteja frente a la enfermedad y la depresión del crecimiento en pollos jóvenes, y proteja también frente a la transmisión vertical desde aves reproductoras infectadas y a posibles efectos morbosos que el virus verticalmente transmitido pueda causar sobre el embrión en desarrollo y el polluelo salido del cascarón.

25 La vacuna para administración a aves reproductoras tendría beneficios saludables para el embrión en desarrollo y para el polluelo joven en crecimiento. También se puede administrar la vacuna a los polluelos tomateros en crecimiento.

**Detección del virus**

35 La presencia de un virus en muestras puede ser detectada por el crecimiento del virus infeccioso en embriones o en cultivo celular. Alternativamente, usando la inmunohistoquímica, se puede detectar un virus (o, más correctamente, un antígeno vírico) en muestras tisulares de pollos infectados. Esto implica la recogida de tejido fresco, la fijación del tejido en formol, el empapamiento en parafina, el corte de secciones tisulares muy delgadas y el uso de anticuerpos específicos del virus (por ejemplo, un antisuero monoclonal o un antisuero policlonal muy específico) para teñir el antígeno vírico en la sección tisular. Los anticuerpos unidos serían detectados mediante un producto de conjugación de enzima secundaria-anticuerpo.

El antígeno vírico puede ser también detectado en secciones tisulares congeladas, usando anticuerpos de un modo similar.

En el caso de un astrovirus que infecta el tracto intestinal, el virus es a veces excretado en grandes cantidades por las heces.

- 5 La presencia de antígeno vírico puede ser detectada en muestras o torundas fecales usando un ensayo ELISA para detección de antígenos. Típicamente, esto implica el uso de un anticuerpo específico del virus (inmovilizado en una superficie de plástico) que se una a, y "capture", las partículas víricas presentes en las muestras fecales diluidas. Las partículas víricas capturadas son luego hechas reaccionar con otro antisuero víricamente específico que ha sido conjugado con una enzima, tal como peroxidasa de rábano picante. La presencia de producto de conjugación unido se demuestra, tras la adición del sustrato de la enzima, por la conversión de éste en un producto coloreado.

- 10 Los pollos responderán a la infección produciendo anticuerpos hacia el CAstV-3. Los anticuerpos presentes en el suero pueden ser detectados utilizando una diversidad de ensayos, tales como el ensayo de inmunofluorescencia indirecta, la neutralización de virus o el ELISA, que es particularmente útil para el procesamiento de grandes muestras. Típicamente, un ELISA indirecto implicaría la inmovilización del virus o el antígeno vírico en la placa de plástico para microtitulación, la reacción con diluciones del suero para permitir que los anticuerpos se unan, la reacción con un anticuerpo inmunoglobulínico secundario anti-pollo, conjugado con una enzima, y luego la reacción con el sustrato de la enzima. Alternativamente, se puede utilizar un ELISA de bloqueo. Esto implicaría demostrar la presencia de anticuerpos de pollo víricamente específicos por su capacidad para "bloquear" la reacción entre el antígeno vírico inmovilizado y un anticuerpo (normalmente un anticuerpo monoclonal) víricamente específico.

- 15 Se pueden llevar a cabo la producción y la caracterización de anticuerpos monoclonales y se pueden utilizar anticuerpos monoclonales en el desarrollo de ensayos diagnósticos tales como los ensayos utilizados para detectar un anticuerpo sérico hacia el agente infeccioso.

Alternativamente, se puede utilizar un ensayo por PCR. Más adelante se proporcionan detalles de dicho ensayo.

- 20 Se ha desarrollado un ensayo prototípico por RT-PCR en que los cebadores directo (ID. SEC. nº 6) e inverso (ID. SEC. nº 7) se basan en secuencias conservadas halladas en los fragmentos de 391 nucleótidos especificados por los productos de aislamiento de 11672 y FP3 (ID. SEC. números 1-3) y multiplicados mediante el planteamiento de RT-PCR con cebadores degenerados. El ensayo prototípico permitió multiplicar un producto de 187 pares de bases (Figura 3) y se halló que dicho ensayo era de 10 a 100 veces más sensible que el método que implicaba la inoculación en cultivo celular seguida de inmunofluorescencia indirecta. El ensayo prototípico permitió detectar exitosamente CAstV-3 en muestras de contenido intestinal obtenidas de polluelos de 1 día de edad salidos del cascarón de pollos reproductores "centinela".

- 25 En este experimento, se obtuvieron aproximadamente 50 hembras jóvenes de un grupo de aves con buen estado de salud. Éstas se dispusieron en gallineros con un grupo de aves reproductoras enfermas que estaban produciendo polluelos descendientes débiles. Los machos del grupo de aves reproductoras enfermas se dispusieron en gallineros con las hembras. Cuando las hembras empezaron a poner, los huevos de las hembras fueron separadamente incubados y dejados eclosionar, y los polluelos descendientes fueron examinados en cuanto a la presencia de CAstV-3. Se investigaron doce polluelos descendientes de 1 día de edad a intervalos semanales. Se sacrificaron los polluelos y se recogieron muestras de intestino, hígado, riñón y corazón de aves individuales.

- 30 Con cada uno de los envíos de 12 polluelos, los intestinos de 6 polluelos fueron reunidos y fueron procesados mediante el método de ultracentrifugación usado para detectar el ELV 11672 (anterior) en contenidos intestinales de polluelos con crecimiento desigual. Estas preparaciones fueron inoculadas en células de CEL desarrolladas en cubreobjetos y, después de una incubación de 48 horas, los cultivos que habían recibido inóculo fueron teñidos en relación con la presencia de antígeno del virus 11672 usando el ensayo de IF indirecta previamente descrito. No se detectó el virus 11672 en ninguna de las preparaciones producidas a partir de los envíos de descendientes (Tabla 5).

- 35 Se extrajo RNA de partes alícuotas de las muestras intestinales reunidas (producidas por ultracentrifugación) y se examinó mediante el ensayo prototípico por RT-PCR. De las 13 muestras examinadas, 8 resultaron positivas para RNA de virus 11672. Las muestras positivas fueron intermitentemente obtenidas de los primeros envíos (7/3/05) a algunos de los últimos envíos (31/5/05). Estos resultados indicaban que los adultos centinela habían resultado infectados con el virus 11672 presente en el alojamiento y que era probable que hubiera tenido lugar una transmisión vertical. El perfil de detección, en que se detectaron muestras positivas a lo largo de un periodo de 12 semanas, sugería que la propagación del virus 11672 era lenta o que la transmisión del virus a partir de las aves parentales infectadas continuaba durante largos periodos. Está en curso un trabajo para determinar si la detección de CAstV-3 esta asociada con problemas de debilidad o de retraso del crecimiento en los polluelos descendientes.

Tabla 5: Detección de CAstV-3 en polluelos descendientes procedentes de pollos reproductores centinela

Envío/Fecha	IIF con células de CEL	RT-PCR
1: 21/02/05	–	No examinado
2: 28/02/05	–	No examinado
3: 7/03/07	–	+
4: 14/03/05	–	+
5: 21/03/05	–	–
6: 30/03/05	–	+
7: 4/04/05	–	–
8: 11/04/05	–	–
9: 18/04/05	–	+
10: 25/04/05	–	–
11: 3/05/05	–	–
12: 9/05/05	–	+
13: 16/05/05	–	+
14: 23/05/05	–	+
15: 31/05/05	–	+
16: 6/06/05	–	No examinado

- 5 Estando ahora descrito con detalle el invento, resultará evidente a quien tiene una experiencia normal en la técnica que se pueden realizar cambios y modificaciones en aquél sin apartarse del alcance de las reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

1. Una cepa aislada de astrovirus denominada CAstV-3, en que dicha cepa es la depositada bajo el número de Acceso CNCM I-3541 en el CNCM, Instituto Pasteur, el 15 de diciembre de 2005.
2. Una secuencia de nucleótidos aislada que tiene una identidad secuencial de al menos 85% con respecto a
  - 5 (a) una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,
  - (b) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse bajo condiciones rigurosas con una porción de la ID. SEC. nº 4, que codifica un polipéptido antigénico capaz de generar una respuesta inmunogénica contra el astrovirus de tipo 3 del pollo, o
  - 10 (c) un fragmento de la ID. SEC. nº 4, en que dicho fragmento es capaz de codificar una secuencia de aminoácidos de al menos un sitio antigénico proporcionado por una proteína de la cápsida del astrovirus de tipo 3 del pollo (CAstV-3),en que la identidad secuencial se refiere al porcentaje de restos de dos secuencias que son idénticos cuando se alinean éstas para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada, en que la ventana de comparación especificada es todos los restos de las secuencias.
- 15 3. Una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos aislada como la reivindicada en la Reivindicación 2 y una secuencia de control.
4. Un vector que comprende una secuencia de nucleótidos aislada como la reivindicada en la Reivindicación 2 y un promotor que está operativamente enlazado a dicha secuencia de nucleótidos.
- 20 5. Un método para producir un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos de la Reivindicación 2, que incluye las operaciones de:
  - (a) poner una célula bacteriana y/o una célula de insecto a través de un baculovirus y/o una célula de levadura y/o una célula vegetal en contacto con un vector como el reivindicado en la Reivindicación 4, y
  - (b) cultivar dicha célula bacteriana y/o célula de insecto y/o célula de levadura y/o célula vegetal bajo unas condiciones adecuadas para la producción del polipéptido.
- 25 6. Una secuencia polipeptídica que tiene una identidad secuencial de al menos 85% con respecto a un polipéptido con una secuencia de aminoácidos como la expuesta en la ID. SEC. nº 5, en que la identidad secuencial se refiere al porcentaje de restos que son idénticos cuando se alinean para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada, en que la ventana de comparación es todos los aminoácidos de la ID. SEC. nº 5.
- 30 7. Una secuencia polipeptídica como la reivindicada en la Reivindicación 6, codificada por una secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 4.
8. Una secuencia polipeptídica como la reivindicada en la Reivindicación 6, que comprende la secuencia de aminoácidos de ID. SEC. nº 5 o un fragmento de la misma, en que dicho fragmento es una secuencia de aminoácidos de al menos un sitio antigénico proporcionado por una proteína de la cápsida del astrovirus de tipo 3 del pollo.
- 35 9. Un anticuerpo policlonal, en que dicho anticuerpo policlonal presenta especificidad ligante hacia un polipéptido de cualquiera de las Reivindicaciones 6 a 8.
10. Un anticuerpo monoclonal, en que dicho anticuerpo monoclonal presenta especificidad ligante hacia un polipéptido de cualquiera de las Reivindicaciones 6 a 8.
- 40 11. El uso de:
  - (i) al menos parte de una cepa de astrovirus aislada, denominada CAstV-3, como la definida en la Reivindicación 1,
  - (ii) una secuencia de nucleótidos como la reivindicada en la Reivindicación 2, o
  - (iii) un polipéptido como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 6 a 8,
- 45 en la preparación de una composición que es capaz de mediar en una respuesta inmune en un ave.

12. Una composición que comprende:

- (i) al menos parte de una cepa de astrovirus aislada, denominada CAstV-3, como la definida en la Reivindicación 1,
- (ii) al menos una secuencia de nucleótidos como la reivindicada en la Reivindicación 2, o
- (iii) al menos un polipéptido como el reivindicado en cualquiera de las Reivindicaciones 6 a 8.

13. Una vacuna para inmunización frente a la depresión del crecimiento en un ave, en que dicha vacuna comprende una composición como la reivindicada en la Reivindicación 12 y un agente adyuvante.

14. Un método de ensayo diagnóstico para la detección del astrovirus de tipo 3 del pollo en muestras de aves, que comprende las operaciones de:

- (i) poner un material fisiológico aviar en contacto con una sonda, en que dicha sonda es seleccionada de entre:
  - (a) una secuencia de nucleótidos como la expuesta en cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,
  - (b) una secuencia de nucleótidos que es capaz de hibridarse bajo condiciones rigurosas con una porción de la ID. SEC. nº 4 que codifica un polipéptido antigénico capaz de generar una respuesta inmunogénica contra el astrovirus de tipo 3 del pollo,
  - (c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad secuencial de al menos 85% con respecto a una secuencia de nucleótidos como la expuesta mediante la ID. SEC. nº 4, en que dicha secuencia de nucleótidos es capaz de codificar una secuencia de aminoácidos de al menos un sitio antigénico proporcionado por una proteína de la cápsida del astrovirus de tipo 3 del pollo, en que la identidad secuencial se refiere al porcentaje de restos de dos secuencias que son idénticos cuando se alinean éstas para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada, en que la ventana de comparación especificada es todos los restos de las secuencias,
  - (d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 4, en que dicho fragmento es capaz de codificar una secuencia de aminoácidos de al menos un sitio antigénico proporcionado por una proteína de la cápsida del astrovirus de tipo 3 del pollo,
  - (e) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos como la expuesta mediante la ID. SEC. nº 4 o un fragmento de la misma, en que dicho fragmento es capaz de codificar una secuencia de aminoácidos de al menos un sitio antigénico proporcionado por una proteína de la cápsida del astrovirus de tipo 3 del pollo, y
  - (f) un anticuerpo con especificidad ligante hacia un polipéptido de (e), y
- (ii) detectar un proceso de unión exitoso entre la sonda y al menos un componente de la muestra.

15. Un método de ensayo diagnóstico como el reivindicado en la Reivindicación 14, que comprende las operaciones de:

- poner un material fisiológico aviar en contacto con al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo,
- incubar el material fisiológico aviar y al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo de modo que todo anticuerpo presente en la muestra que sea capaz de unirse a al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo se una a la al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo, y
- detectar la presencia de dicho anticuerpo unido.

16. Un método de ensayo diagnóstico como el reivindicado en la Reivindicación 14, que comprende las operaciones de:

- poner una muestra de material fisiológico aviar en contacto con un anticuerpo que se une específicamente a al menos parte del astrovirus de tipo 3 del pollo,
- incubar el material fisiológico aviar con dicho anticuerpo de modo que todo astrovirus de tipo 3 del pollo presente en la muestra se una a dicho anticuerpo, y
- detectar la presencia de dicho astrovirus de tipo 3 del pollo presente en la muestra.

17. Un kit diagnóstico para uso en el diagnóstico del astrovirus de tipo 3 del pollo (CAstV-3), que comprende una sonda, en que dicha sonda es al menos una de:

- (a) una secuencia como la expuesta en cualquiera de las ID. SEC. números 1 a 4,
- 5 (b) una secuencia que es capaz de hibridarse bajo condiciones rigurosas con una porción de la ID. SEC. nº 4 que codifica un polipéptido antigénico capaz de generar una respuesta inmunogénica contra el astrovirus de tipo 3 del pollo,
- 10 (c) una secuencia de nucleótidos que tiene una identidad secuencial de al menos 85% con respecto a una secuencia de nucleótidos como la expuesta mediante la ID. SEC. nº 4, en que dicha secuencia de nucleótidos es capaz de codificar una secuencia de aminoácidos de al menos un sitio antigénico proporcionado por una proteína de la cápsida del astrovirus de tipo 3 del pollo, en que la identidad secuencial se refiere al porcentaje de restos de dos secuencias que son idénticos cuando se alinean éstas para una máxima correspondencia a lo largo de una ventana de comparación especificada, en que la ventana de comparación especificada es todos los restos de las secuencias,
- 15 (d) un fragmento de una secuencia de nucleótidos de ID. SEC. nº 4, en que dicho fragmento es capaz de codificar una secuencia de aminoácidos de al menos un sitio antigénico proporcionado por una proteína de la cápsida del astrovirus de tipo 3 del pollo,
- (e) un polipéptido codificado por una secuencia de nucleótidos como la expuesta mediante la ID. SEC. nº 4 o un fragmento de la misma, en que dicho fragmento es capaz de codificar una secuencia de aminoácidos de al menos un sitio antigénico proporcionado por una proteína de la cápsida del astrovirus de tipo 3 del pollo, y
- 20 (f) un anticuerpo con especificidad ligante hacia un polipéptido de (e).

	ELV3(a)	ELV3(b)	CAstV-1 ANV	ELV1(a)	CASTV-2	ELV4	TAstV-1	TAstV-2
ELV3(a)	-	98,5	47,7	47,7	84,6	83,8	58,8	70,8
ELV3(b)	-	-	48,5	48,5	84,6	85,4	58,0	70,0
CAstV-1 ANV			-	92,2	49,2	49,2	45,8	51,5
ELV1(a)				-	50,8	50,0	46,6	52,2
CAstV-2					-	94,6	57,3	70,0
ELV4						-	56,5	70,0
TAstV-1							-	57,3
TAstV-2								-

Figura 1



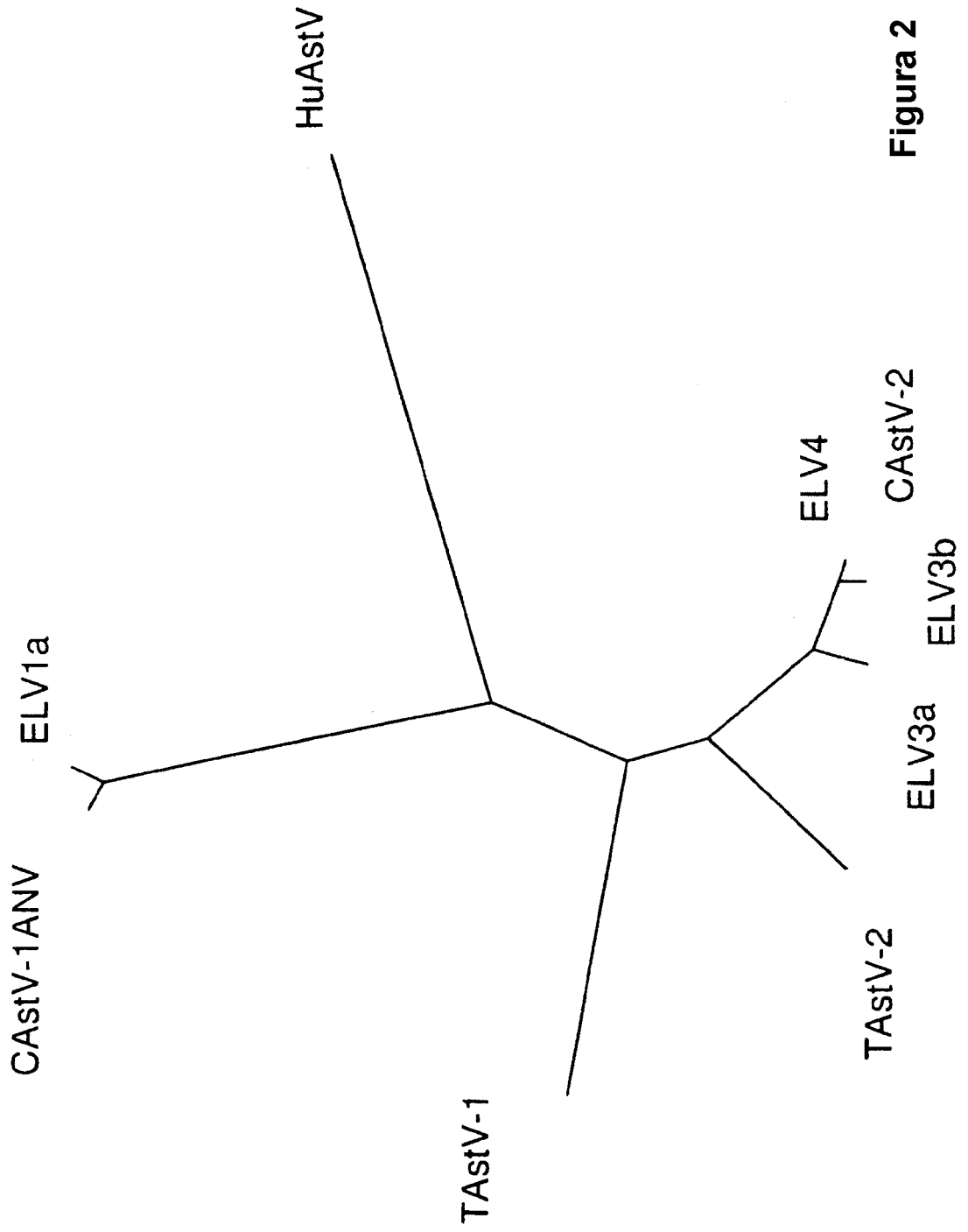
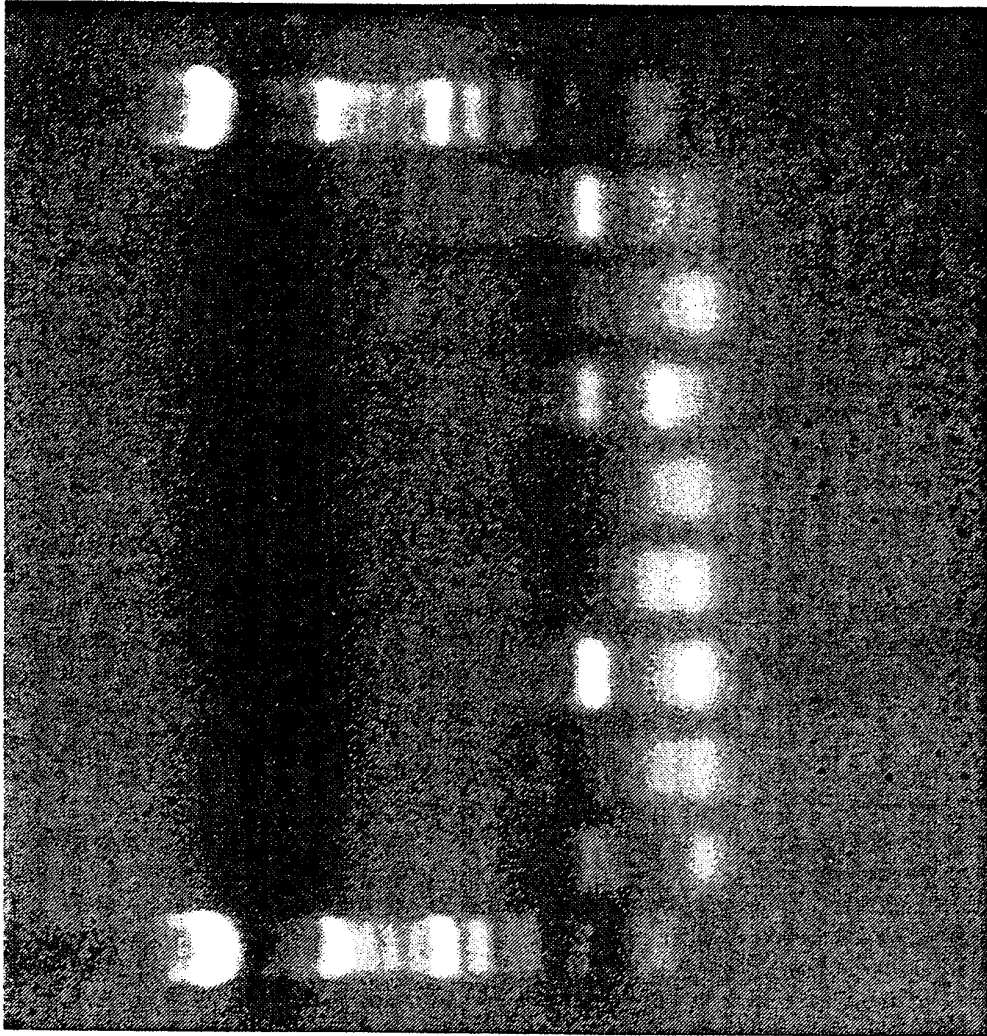


Figura 2



Producto  
de RT-PCR  
de 187 bp

↑

Figura 3