

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 437 148**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

C07K 14/195 (2006.01)

C07K 16/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.02.2009 E 09709287 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2013 EP 2251693**

54 Título: **Método y kit para detección de anticuerpo anti-Avibacterium paragallinarum**

30 Prioridad:

08.02.2008 JP 2008029589

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

09.01.2014

73 Titular/es:

**THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH
INSTITUTE (100.0%)
1-6-1 Okubo, Kita-ku, Kumamoto-shi
Kumamoto 860-8568, JP**

72 Inventor/es:

**USHIJIMA, TOSHIHIRO;
IMAMURA, TAKASHI;
SAKAMOTO, RYUICHI y
SAKAGUCHI, MASASHI**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 437 148 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método y kit para detección de anticuerpo anti-*Avibacterium paragallinarum*

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a un método y a un kit para detectar un anticuerpo frente a *Avibacterium paragallinarum*. Específicamente, la presente invención se refiere a un método para detectar un anticuerpo frente a *Avibacterium paragallinarum* (denominado en lo sucesivo en el presente documento también "A.pg"; denominada previamente *Haemophilus paragallinarum*) que comprende detectar un anticuerpo inducido por una proteína de membrana exterior (denominada en lo sucesivo en el presente documento también "polipéptido p210 de HMT") de serotipo A y/o serotipo C de *Avibacterium paragallinarum* mediante ELISA con una fase sólida a la cual se inmoviliza un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de región no homóloga de dicha proteína de membrana exterior o una parte de la misma y un kit de detección usado para dicho método. Aunque un péptido se denomina dipéptido, tripéptido, oligopéptido, polipéptido y similares dependiendo del número de restos de aminoácidos que constituyen dicho péptido, un péptido como se usa en el presente documento se define simplemente como "péptido" que abarca cualquiera de estos péptidos.

20 **Antecedentes de la técnica**

La coriza infecciosa aviar causada por infección con A.pg se conoce como enfermedades respiratorias importantes en aves de corral. Las aves de corral que sufren de coriza infecciosa aviar tienen secreción nasal, hinchazón de la cara y epifora como síntomas cardinales. La coriza infecciosa aviar provoca un gran daño económico ya que conduce a la disminución de la tasa de reproducción de las aves de corral, retrasa la puesta de huevos, disminuye la producción de huevos o produce el fracaso de la puesta de huevos.

Page *et al.* clasificaron A.pg en tres serotipos A, B y C (Referencia no de patente 1), mientras que Sawata *et al.* lo clasificaron en dos serotipos 1 y 2 (Referencia no de patente 2). Posteriormente, Kume *et al.* indicaron que el serotipo A de Page corresponde al serotipo 1 de Sawata *et al.* mientras que el serotipo C de Page corresponde al serotipo 2 de Sawata *et al.* (Referencias no de patente 3 y 4). Actualmente, el serotipo A (serotipo 1) de A.pg (denominado en lo sucesivo en el presente documento también "A.pg-A") y el serotipo C (serotipo 2) de A.pg (denominado en lo sucesivo en el presente documento también "A.pg-C") se consideran un agente causal principal de coriza infecciosa aviar.

Para la protección de coriza infecciosa aviar, se ha usado ampliamente hasta el momento una vacuna inactivada que se obtiene inactivando las células de A.pg-A o A.pg-C con formalina, timerosal y similares. Sin embargo, los efectos secundarios adversos provocados por tal vacuna inactivada han sido un problema ya que se han informado lesiones necróticas locales que se forman en los pollos inoculados cuando se administra la vacuna (Referencia no de patente 5) y, por lo tanto, existe un gran deseo del desarrollo de una vacuna altamente segura.

En estas circunstancias, se han desarrollado o están en desarrollo una vacuna de componente donde se usa únicamente un antígeno protector, es decir, un componente eficaz, obtenido a partir de células bacterianas o sobrenadante de cultivo; una vacuna recombinante donde un gen que codifica un antígeno protector se clona mediante una técnica de recombinación genética y se expresa en bacterias, levaduras, células animales, células de planta, células de insecto y similares y se purifica y usa un producto expresado en una gran cantidad; y una vacuna de vector donde se inserta un gen que codifica un antígeno protector en un vector viral y similares.

Por ejemplo, Tokunaga *et al.* han purificado de forma satisfactoria, a partir de cultivo de A.pg-A, un polipéptido que tiene aproximadamente 130 kd de peso molecular a partir de dicho A.pg-A, induciendo dicho polipéptido a la producción de un anticuerpo de inhibición de hemaglutinación (anticuerpo HI) y protegiendo frente a coriza infecciosa aviar por A.pg-A (Referencia de patente 1). Además, han clonado un fragmento de ADN que codifica dicho polipéptido de 130 Kd y expresado dicho fragmento de gen en *E. coli* para encontrar que el polipéptido producido podría proteger de coriza infecciosa aviar provocada por serotipo A de *Avibacterium paragallinarum*. Además, han usado dicho fragmento de ADN que codifica el polipéptido de 130 Kd como una sonda para identificar un gen p210 de HMT que codifica el polipéptido p210 de HMT de serotipo A, una proteína de membrana exterior que tiene una actividad de hemaglutinación, que consiste en 2042 aminoácidos. También han clonado a partir del serotipo C de *Avibacterium paragallinarum* un fragmento de ADN hibridable con dicho fragmento de ADN para obtener el gen p210 de HMT de serotipo C (Referencia de patente 2). Ellos compararon las secuencias de nucleótidos de fase de lectura abierta de genes p210 de HMT de serotipos A y C de *Avibacterium paragallinarum* para informar que la homología entre ambos genes era de aproximadamente el 80% como un todo y que una región de aproximadamente 3,4 kpb en el extremo 5' (denominada en lo sucesivo en el presente documento "región 1") y una región de aproximadamente 1,2 kpb en el extremo 3' (denominada en lo sucesivo en el presente documento "región 3") tenían una homología muy elevada mientras que una región de aproximadamente 1,5 kpb flanqueada por las dos regiones (denominada en lo sucesivo en el presente documento "región 2") tenía una homología baja (Referencia de patente 2).

También se informó por Noro *et al.* que el gen p210 de HMT descubierto por Tokunaga *et al.* es importante para una región diana de una vacuna específica de serotipo. Noro *et al.* informaron que, mediante la inmunización de aves de corral con un péptido codificado por el fragmento de ADN desde 4801 pb hasta 5157 pb, que es una parte del gen p210 de HMT que codifica el polipéptido p210 de HMT de A.pg-A, dicho péptido inducía un anticuerpo HI y tenía un efecto de vacuna frente a A.pg-A (Referencia de patente 3). Noro *et al.* también informaron en la 143ª Reunión de la Sociedad Japonesa de Ciencias Veterinarias celebrada el 3-5 de abril de 2007, en Japón que, mediante la inmunización de las aves de corral con un péptido codificado por un fragmento de ADN de 5,5 kpb, que es una parte del gen p210 de HMT que codifica el polipéptido p210 de HMT de A.pg-C, dicho péptido inducía un anticuerpo HI y tenía un efecto de vacuna frente a A.pg-C.

El diagnóstico sérico no se ha llevado a cabo para coriza infecciosa aviar ya que, además del avance agudo de la enfermedad, las aves de corral infectadas con A.pg no son propensas a inducir un anticuerpo incluso después de la aparición de la enfermedad. Por otra parte, las aves de corral sometidas a vacunación inducen un anticuerpo frente a hemaglutinina (denominada en lo sucesivo en el presente documento también "HA") en la superficie de las células de A.pg y, para la estimación del efecto de vacuna *in vitro*, se ha llevado a cabo un ensayo de inhibición de hemaglutinación (denominado en lo sucesivo en el presente documento también "ensayo HI") con un anticuerpo anti-HA. El ensayo HI, donde se usan eritrocitos de pollo frescos o eritrocitos de pollo fijados con glutaraldehído, se indica que tiene defectos: (1) ya que los eritrocitos de pollo frescos son necesarios para la estimación del efecto de vacuna de A.pg-A, es problemático y requiere mucho trabajo tal como obtener pollos para sangre (criar y manejar pollos e condición de separación de los patógenos), toma de muestras de sangre, tratamiento de la sangre y similares, (2) no es probable obtener resultados estables ya que los resultados pueden estar influidos por los lotes de eritrocitos de pollo y la estimación de un título de anticuerpo se realiza mediante la subjetividad de una persona que lo mide.

Por otra parte, Sun *et al.* indicaron, para diagnóstico sérico alternativo de ensayo HI, ELISA de bloqueo (B-ELISA) usando un anticuerpo monoclonal específico de serotipo (Referencia no de patente 6). El B-ELISA es un ELISA donde se usaron células de serotipo A o C alteradas mediante sonicación como un antígeno y se usaron anticuerpos monoclonales reactivos con los serotipos respectivos para detectar de forma competitiva los anticuerpos en sueros. Este método es provechoso en el sentido de que tiene una sensibilidad mayor que el ensayo de HI y puede tratar múltiples anticuerpos. Sin embargo, requiere cuatro etapas, es decir, adición de suero, adición de anticuerpos monoclonales, adición de anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con HRP y adición de un sustrato para desarrollo, una etapa más que en ELISA ordinario, generando procedimientos problemáticos. También, para este método, es necesario obtener anticuerpos monoclonales específicos de serotipo. Para la fabricación de un kit, habrá que preparar y añadir una placa inmovilizada con un antígeno y suero de referencia así como también anticuerpos monoclonales. Además, se observa que dicho B-ELISA es un sistema que detecta un anticuerpo frente a únicamente un epítipo antigénico reconocido por un anticuerpo monoclonal único para los serotipos respectivos. Sin embargo, con un sistema que detecta un anticuerpo frente a un epítipo único, cuando dicho epítipo se pierde debido a mutación de A.pg, es altamente probable que no se detecte su infección o un anticuerpo inducido por vacunación.

Además, un kit de ELISA de bloqueo para el diagnóstico de coriza infecciosa se ha descrito previamente (Miao *et al.*, Avian Pathology (29): 219-225, 2000) aplicando anticuerpos específicos para anticuerpos frente a serotipo A o serotipo C de *Haemophilus paragallinarum*. Además, se ha descrito un polipéptido a partir de *Xaemophilus paragallinarum* en prevención de coriza infecciosa aviar (documento EP 0 870 828 A1). Además, en Tokunaga *et al.*; Nippon Jui Gakkai Gakujutsu Shukai Koen Yoshishu (129): 229; 1998, documento JP 10 084969 A, documento JP 64 000467 A, documento JP 2002 154983 A se desvelan antecedentes de la técnica adicionales, así como también en Noro *et al.*, Nippon Jui Gakkai Gakujutsu Shukai Koen Yoshishu (139): 212; 2005.

Referencia de Patente 1: Publicación de Patente Japonesa Nº 10-84969

Referencia de Patente 2: documento WO98/12331

Referencia de Patente 3: Publicación de Patente Japonesa Nº 2005-218414

Referencia no de patente 1: Am. J. Vet. Res., 23: 85-95, 1962

Referencia no de patente 2: Jpn. J. Vet. Sci., 40: 645-652, 1978

Referencia no de patente 3: Am. J. Vet. Res., 41: 757-760, 1980

Referencia no de patente 4: Am. J. Vet. Res., 41: 1901-1904, 1980

Referencia no de patente 5: Avian Dis., 15: 109-117, 1971

Referencia no de patente 6: Int. Ass. Bio. (IABS), 35: 317-320, 2007

Divulgación de la invención

(Problema técnico a solucionar por la invención)

- 5 Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para detectar anticuerpos, específicamente anticuerpos frente a serotipo A y a serotipo C de A.pg, respectivamente.

10 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un método para detección de un anticuerpo frente a *Avibacterium paragallinarum* caracterizado por que dicho método comprende la medición de anticuerpo sometiendo a reacción al menos un antígeno de Péptido A o Péptido B más adelante con una muestra:

Péptido A:

15 que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que consiste en una cadena peptídica de 6 o más restos de aminoácidos y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1.

Péptido B:

20 que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, que consiste en una cadena peptídica de 6 o más restos de aminoácidos y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 38-68 de SEC ID N°: 2.

25 Específicamente se proporciona un método para detectar anticuerpos que se caracteriza por el uso de un péptido antigénico recombinante con el cual los anticuerpos frente a serotipo A y a serotipo C de A.pg, respectivamente, se pueden distinguir entre sí. Más específicamente, se proporciona un método para detectar anticuerpos que se caracteriza por el uso de un péptido antigénico recombinante que comprende una secuencia de aminoácidos dentro de una región que tiene homología baja entre proteínas de membrana exterior del serotipo A y serotipo C de A.pg.

(Medios para resolver los problemas)

30 En estas circunstancias, los presentes inventores han investigado de forma asidua de forma de conseguir los objetos mencionados anteriormente y, como resultado, han encontrado que una secuencia de aminoácidos homóloga entre A.pg-A y A.pg-C está incluida en la secuencia de aminoácidos de la región 2, localizada de forma separada, del polipéptido p210 codificado por el gen p210 de HMT, un antígeno de vacuna importante, (entre 31 restos de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1 para A.pg-A y de los aminoácidos N° 38-68 de SEC ID N°: 2 para A.pg-C, 29 restos de aminoácidos son idénticos, consúltese la Figura 3) y que dicha secuencia de aminoácidos forma un epítipo. Además, los presentes inventores han encontrado que una secuencia de aminoácidos altamente homóloga entre A.pg-A y A.pg-C está incluida en una parte de la región 2 como se define por Tokunaga *et al.* Por tanto, para los polipéptidos p210 de HMT para A.pg-A y A.pg-C, los presentes inventores han preparado péptidos que no incluyen las dos secuencias de aminoácidos homólogas anteriores y usaron dichos péptidos para ELISA con una placa de microtitulación donde dichos péptidos se inmovilizan para medición de anticuerpos. Como resultado, se comprobó que los anticuerpos inducidos por una vacuna a partir de A.pg-A y una vacuna a partir de A.pg-C, respectivamente, podrían distinguirse específicamente los unos de los otros, para completar de ese modo la presente invención.

45 Por tanto, la presente invención incluye los siguientes:

- (1) Un método para la detección de un anticuerpo frente a serotipo A o serotipo C de *Avibacterium paragallinarum* caracterizado por que dicho método comprende medición de anticuerpo sometiendo a reacción al menos un antígeno de Péptido A o Péptido B más adelante con una muestra:

Péptido A:

50 que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que consiste en una cadena peptídica de 6 o más restos de aminoácidos y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1, donde dicho péptido detecta anticuerpos específicos de serotipo A.

Péptido B:

55 que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, que consiste en una cadena peptídica de 6 o más restos de aminoácidos y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 38-68 de SEC ID N°: 2, donde dicho péptido detecta anticuerpos específicos de serotipo C.

- 60 (2) El método para detección de (1) anteriormente donde el Péptido A o el Péptido B es una cadena peptídica de 10 o más restos de aminoácidos.
 (3) El método de detección de (1) anteriormente donde el Péptido A o el Péptido B es una cadena peptídica de 20 o más restos de aminoácidos.
 65 (4) El método para detección de (1) anteriormente donde el Péptido A o el Péptido B es una cadena peptídica como se indica a continuación:

Péptido A:

que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 8-236 de SEC ID N°: 1 y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1;

5 Péptido B:

que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 69-452 de SEC ID N°: 2 y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 38-68 de SEC ID N°: 2

10 (5) El método para detección de (1) anteriormente donde el Péptido A o el Péptido B es una cadena peptídica como se indica a continuación:

Péptido A:

que es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 8-236 de SEC ID N°: 1;

15 Péptido B:

que es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 69-452 de SEC ID N°: 2.

20 (6) El método para detección de (4) anteriormente donde el Péptido A es una cadena peptídica como se indica a continuación:

Péptido A:

que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 274-445 de SEC ID N°: 1 y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1.

25

(7) El método para detección de (5) anteriormente donde dicho Péptido A es una cadena peptídica como se indica a continuación:

30 Péptido A:

que es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 274-445 de SEC ID N°: 1.

35 (8) El método para detección de cualquiera de (1) a (7) anteriormente donde el Péptido A o el Péptido B es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos donde 1 o más restos de aminoácidos en la misma se suprimen, añaden o sustituyen, donde dicho péptido A detecta anticuerpos específicos de serotipo A y dicho péptido B detecta anticuerpos del serotipo C.

40 (9) El método para la detección de cualquiera de (1) a (8) anteriormente donde la medición de anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en ELISA, transferencia de Western y transferencia puntual.

(10) El método para detección de cualquiera de (1) a (9) anteriormente donde la muestra es sueros de pollos infectados con *Avibacterium paragallinarum* o sueros de pollos a los cuales se ha administrado la vacuna de *Avibacterium paragallinarum*.

45 (11) Un kit para medición de un anticuerpo frente a serotipo A o serotipo C de *Avibacterium paragallinarum* caracterizado por que al menos uno del Péptido A o Péptido B más adelante se usa como un antígeno:

Péptido A:

que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que consiste en una cadena peptídica de 6 o más restos de aminoácidos y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1;

50 Péptido B:

que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, que consiste en una cadena peptídica de 6 o más restos de aminoácidos y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 38-68 de SEC ID N°: 2;

55 (12) El kit para medición de un anticuerpo de (11) anteriormente donde el Péptido A o el Péptido B es una cadena peptídica de 10 o más restos de aminoácidos.

(13) El kit para medición de un anticuerpo de (11) anteriormente donde el Péptido A o Péptido B es una cadena peptídica de 20 o más restos de aminoácidos.

60 (14) El kit para medición de un anticuerpo de (11) anteriormente donde el Péptido A o Péptido B es una cadena peptídica como se indica a continuación:

Péptido A:

que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 8-236 de SEC ID N°: 1 y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1;

65

Péptido B:

que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 69-452 de SEC ID N°: 2 y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 38-68 de SEC ID N°: 2;

5 (15) El kit para medición de un anticuerpo de (11) anteriormente donde el Péptido A o Péptido B es una cadena peptídica como se indica a continuación:

Péptido A:

que es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 8-236 de SEC ID N°: 1;

Péptido B:

que es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 69-452 de SEC ID N°: 2.

10
15 (16) El kit para medición de un anticuerpo de (14) anteriormente donde el Péptido A es una cadena peptídica como se indica a continuación:

Péptido A:

que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 274-445 de SEC ID N°: 1 y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1.

20
25 (17) El kit para medición de un anticuerpo de (15) anteriormente donde el Péptido A es una cadena peptídica como se indica a continuación:

Péptido A:

que es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 274-445 de SEC ID N°: 1.

30 (18) El kit para medición de un anticuerpo de cualquiera de (11) a (17) anteriormente donde el Péptido A o Péptido B es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos donde 1 o varios restos de aminoácidos en la misma se suprimen, añaden o sustituyen.

35 (19) El kit para medición de un anticuerpo de cualquiera de (11) a (18) anteriormente donde la medición de anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en ELISA, transferencia de Western y transferencia puntual.

(20) El kit para medición de un anticuerpo de cualquiera de (11) a (19) anteriormente donde la muestra es sueros de pollos infectados con *Avibacterium paragallinarum* o sueros de pollos a los cuales se ha administrado la vacuna de *Avibacterium paragallinarum*.

40 (Efectos más eficaces que la técnica anterior)

De acuerdo con la presente invención, se proporcionan un método y un kit para detectar un anticuerpo frente a serotipo A o serotipo C de *Avibacterium paragallinarum*. Los péptidos de A.pg-A y de A.pg-C como se usan en el presente documento no incluyen una secuencia de aminoácidos homóloga entre sí y por lo tanto se pueden unir específicamente a un anticuerpo inducido por una vacuna a partir de A.pg-A y un anticuerpo inducido por una vacuna a partir de A.pg-C, respectivamente. Por consiguiente, un método y un kit para la detección de la presente invención posibilitan medir de forma específica un título de anticuerpo para los anticuerpos respectivos frente a las vacunas de A.pg-A y A.pg-C en sueros de pollo no sólo cuando las vacunas respectivas se administran por separado a los pollos sino también cuando se administra una mezcla de las vacunas.

50 Además, la presente invención, debido a que usa un antígeno recombinante purificado, permite la inmovilización de una concentración más elevada de un antígeno que la técnica anterior usando detritos celulares de A.pg y por lo tanto permite la construcción de un sistema para medir un anticuerpo con sensibilidad de detección más elevada. El método para detectar un anticuerpo de la presente invención, ya que usa el péptido antigénico que es capaz de distinguir un serotipo de A.pg, detecta un anticuerpo de forma más sencilla y, en vista de la mutación antigénica de A.pg, de forma más fiable que B-ELISA usando un anticuerpo monoclonal específico de serotipo.

55 Además, mediante el método para detección de la presente invención, se distinguen anticuerpos no sólo en sueros de pollo después de la vacunación sino también en sueros de pollos infectados con A.pg.

60 **Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra el polipéptido p210 de HMT y sus fragmentos con relación posicional de los mismos. Las partes rellenas de negro muestran una secuencia homóloga en la región 2 mientras que las partes sombreadas muestran una secuencia homóloga C terminal en la región 2. La numeración de la secuencia de aminoácidos en la figura corresponde a la de SEC ID N°: 1 (A.pg-A) y SEC ID N°: 5 (A.pg-C) desveladas en la Referencia de

patente 2.

La Figura 2 muestra los resultados de SDS-PAGE para cada uno de los polipéptidos purificados a partir de *E. coli* M: Marcador, Carril 1: P-AΔ6b-1b, Carril 2: P-CΔ6b-1b.

La Figura 3 muestra las secuencias de aminoácidos homólogas y sus posiciones en una región no homóloga de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen p210 de HMT. La numeración de la secuencia de aminoácidos en la figura corresponde a la de SEC ID N°: 1 (A.pg-A) y SEC ID N°: 5 (A.pg-C) desveladas en la Referencia no de patente 2.

La Figura 4 muestra la correlación entre el valor de ELISA de suero antes de exposición a A.pg-A usando el polipéptido P-AΔ6b-2# como un antígeno y la protección desde la aparición de la enfermedad después de la exposición con A.pg-A. En la Figura, • muestra pollos sin aparición de la enfermedad mientras que ○ muestra pollos con aparición de la enfermedad.

La Figura 5 muestra la correlación entre el valor de ELISA de suero antes de exposición con A.pg-C usando el polipéptido P-CΔ6b-1b como un antígeno y la protección desde la aparición de la enfermedad después de la exposición con A.pg-C. En la Figura, ● muestra pollos sin aparición de la enfermedad mientras que ○ muestra pollos con la aparición de la enfermedad.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se caracteriza por un método y un kit para detección de un anticuerpo frente a serotipo A o serotipo C de *Avibacterium paragallinarum* mediante medición de anticuerpo usando como un antígeno péptidos obtenidos eliminando una secuencia de aminoácidos homóloga entre A.pg-A y A.pg-C ligeramente presente en una región no homóloga de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen p210 de HMT obtenido de A.pg.

Para el método para la detección de un anticuerpo frente a *Avibacterium paragallinarum* de la presente invención, se usa una región no homóloga o una parte de la misma de la secuencia de aminoácidos codificada por el gen p210 de HMT obtenido de A.pg-A y/o A.pg-C como antígeno. Una región no homóloga como se usa en el presente documento se define como una región de aproximadamente 1,3 kpb (SEC ID N°: 1 para A.pg-A y SEC ID N°: 2 para A.pg-C) que se obtiene eliminando una secuencia homóloga en el extremo C a partir de la secuencia de aminoácidos codificada por una región de ADN de aproximadamente 1,5 kpb (región 2) flanqueada por la secuencia de aminoácidos codificada por una región de ADN de aproximadamente 3,4 kpb (región 1) en el extremo 5' y la secuencia de aminoácidos codificada por una región de ADN de aproximadamente 1,2 kpb (región 3) en el extremo 3' (consúltese la Figura 1). Un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de la región no homóloga se denomina en lo sucesivo en el presente documento un "gen A.pg-1.3" o también se denomina "gen A.pg-AI.3" y "gen A.pg-CI.3" para diferenciar A.pg-A de A.pg-C.

Para las tres cepas de A.pg-A (cepa 221, cepa 053 y cepa W) aisladas a partir de pollos infectados con A.pg, la secuencia de nucleótidos correspondiente a una región no homóloga del gen p210 de HMT es perfectamente consistente entre la cepa 053 y la cepa W y difiere únicamente en un nucleótido entre estas dos cepas y la cepa 221. Por otra parte, para tres cepas de A.pg-C (cepa 53-47, cepa Modest y cepa NK-1), dicho nucleótido es tal que la cepa Modest y la cepa NK-1 tenían supresión de 3 nucleótidos (1 aminoácido) en comparación con la cepa 53-47. Por consiguiente, se puede decir que una región no homóloga del mismo serotipo está altamente conservada y por tanto cualquier cepa del mismo serotipo se puede usar para la presente invención.

Un gen de A.pg-1.3 y un fragmento de ADN que contiene dicho gen se pueden obtener como se ha descrito más adelante. Para cultivo de A.pg, se puede usar un medio de cultivo que contiene de forma apropiada polipeptona, glucosa, ácido casamino, glutamato de sodio, extracto de levadura, cloruro de sodio, caldo de pollo, βNAD, suero de pollo y similares. Para la presente invención, se usó un caldo complementado con suero de pollo, que contenía 5 g de polipeptona, 1 g de ácido casamino, 5 g de cloruro de sodio, 5 g de L-glutamato de sodio, 1 g de glucosa, 10 g de extracto de levadura, 175 ml de caldo de pollo, 25 ml suero de pollo y nicotinamida adenina dinucleótido al 0,025% (β-NAD) en 1000 ml de medio de cultivo para desarrollo de una cantidad pequeña a mediana de las células. La condición del cultivo se puede establecer a una temperatura de 37 °C y la duración en un intervalo de 16-24 horas pero se puede ajustar de forma adecuada dependiendo del fin de uso, el formato de cultivo, la cantidad de células inoculadas, la escala del medio de cultivo y similares.

Las células en el cultivo se pueden recuperar en un precipitado mediante centrifugación (8.000 rpm, 20 minutos). Un gen p210 de HMT se puede preparar, usando como un material de partida un ARN completo, ARNm o un ADN genómico extraído a partir de las células, mediante una técnica de recombinación genética general como se enseña por Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A Laboratory Manual Segunda Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 1989). En la práctica, se puede usar un kit disponible en el mercado. Por ejemplo, se pueden usar reactivos tales como reactivo TRIzol (Invitrogen), ISOGEN (NIPPON GENE CO., LTD.), kit de purificación de ARN total StrataPrep (TOYOBO) para extracción de ARN, kit de SepaGene (Sanko Junyaku Co., Ltd.), ISOPLANT (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) para extracción de ADN cromosómico, un kit tal como un kit de purificación de ARNm (Amersham Bioscience), kit de aislamiento de ARNm poli (A) Quick (TOYOBO), kit Separador de ARNm (Clontech) para purificación de ARNm, sistema de plásmido SuperScript para síntesis de ADNc y clonación de plásmido (Invitrogen), kit de síntesis de ADNc (TAKARA SHUZO CO., LTD.), kit de Síntesis y Construcción de Bibliotecas de

ADNc SMART PCR (Clontech), sistemas de Construcción de Biblioteca de ADNc Directionary (Novagen Inc.), GeneAmp PCR Gold (Applied Biosystems) para conversión en ADNc.

- Más específicamente, un ADN cromosómico se puede extraer a partir de células recuperadas mediante centrifugación, usando el kit SepaGene (Sanko Junyaku Co., Ltd.) y similares, escindir con una enzima de restricción adecuada, preferentemente EcoRI, insertarse en un vector de clonación disponible en el mercado, por ejemplo λ gt11; New England Biolabs (NEB) para preparar una biblioteca de ADN. Usando los fragmentos de ADN obtenidos como molde, se puede llevar a cabo PCR para amplificar fragmentos de ADN de diversos tamaños usando LA Taq (TAKARA BIO Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto al mismo. Los cebadores para su uso en PCR se pueden diseñar en base a las secuencias de nucleótido de genes p210 de HMT obtenidos de A.pg-A y A.pg-C como lo desveló Tokunaga *et al* (Referencia de patente 1). Los cebadores para PCR pueden estar disponibles fácilmente si se solicitan a servicios de contratistas de síntesis de ADN (por ejemplo, Sigma Genosys Japan K.K.). Cuando se diseñan, se pueden añadir secuencias de nucleótidos de sitios de escisión de enzima de restricción apropiados en el extremo 5' del cebador cadena arriba y en el extremo 5' del cebador cadena abajo. Los productos amplificados por PCR se pueden clonar en un vector de clonación génica, pCR-XL-TOPO (Invitrogen) para preparar el plásmido pCRDNT en el cual se insertan diversos fragmentos de ADN. Una secuencia de nucleótidos de los fragmentos de ADN obtenidos, después de clonarse en pBluescript II SK + (Stratagene) o pCR2.1-TOPO (Invitrogen), se puede determinar con un secuenciador de ADN (ABI Prism 377, Applied Biosystems).
- Como se ha descrito más adelante, en la medida en que no se reduzca la sensibilidad o no se aumente la reacción inespecífica, un péptido en el cual se introduce una mutación de aminoácidos se puede usar como un antígeno para la medición de anticuerpo en la presente invención. Para introducir una mutación en un aminoácido específico en un péptido, se puede emplear de forma habitual mutagénesis dirigida cuando la mutación se introduce en una secuencia de nucleótidos de un fragmento de ADN que codifica dicho péptido. En la práctica, la mutagénesis dirigida se puede llevar a cabo con kits disponibles en el mercado en los cuales se aplica esta técnica, tales como el sistema de Mutagénesis Dirigida (Mutan-Super Express Km, Mutan-Express Km, Mutan-K y similares) de Takara, Kit de Mutagénesis Dirigida QuickChange Multi, Kit de Mutagénesis Dirigida QuickChange XL de Stratagene, Sistema de Mutagénesis Dirigida GeneTailor de Invitrogen, de acuerdo con el protocolo adjunto en los mismos.
- Para obtener fragmentos de ADN que codifican una secuencia de aminoácidos de diversos péptidos que no contienen una secuencia de aminoácidos homóloga entre A.pg-A y A.pg-C, de forma que la secuencia homóloga como se ha descrito anteriormente no estuviera contenida, se puede llevar a cabo una PCR ordinaria usando cebadores diseñados a partir de región no homóloga (la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID N°: 3 para A.pg-A y la secuencia de nucleótidos representada en SEC ID N°: 4 para A.pg-C) y el gen de A.pg-1.3 y un fragmento de ADN que comprende el gen como un molde. En el caso de una secuencia de aminoácidos corta, su fragmento de ADN también se puede preparar mediante síntesis artificial. Los fragmentos de ADN y los cebadores preparados en la presente invención se muestran en la Tabla 1.
- Los fragmentos de ADN obtenidos de este modo se pueden incorporar en un vector de expresión apropiado, que después se puede introducir en un hospedador para expresión de cada uno de los fragmentos de ADN. Para un vector de expresión, se pueden usar pQE30 (QIAGEN) o pET22b (Novagen Inc. o TAKARA BIO Inc.) y similares, seleccionados de forma apropiada. Para expresión de una proteína o péptido heterólogo, bacterias, levaduras, células de animales, células de planta, células de insecto y similares se pueden usar de forma ordinaria, seleccionados de forma apropiada dependiendo del fin de uso. Para la transformación de una célula hospedadora, se pueden usar métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede usar fosfato de calcio, DEAE dextrano, enfoque que usa liposoma de lipofectina, fusión de polietilenglicol de protoplasto, electroporación y similares, seleccionados de forma apropiada dependiendo de una célula hospedadora según se use. Para expresión de cada uno de los fragmentos de ADN de la presente invención, se puede usar *E. coli* que permite la expresión en una cantidad grande. Para expresión en *E. coli*, se han desarrollado diversos vectores de expresión que tienen el promotor trp, promotor T7, promotor cspA y similares y están disponibles en el mercado y se pueden usar según sea apropiado. Dependiendo de un vector de expresión, *E. coli* adecuada tal como BL21, HMS174, DH5 α , HB101, JM109 y similares se pueden seleccionar como un hospedador. La transformación de *E. coli* se puede llevar a cabo usando células competentes disponibles en el mercado de acuerdo con el protocolo adjunto en las mismas. Por tanto, se puede obtener *E. coli* recombinante que produce el polipéptido deseado. Para medio de cultivo (por ejemplo, LB, SOC, SOB y similares) usados para cultivo de *E. coli*, se pueden usar reactivos usados para selección de transformante (por ejemplo, ampicilina) y reactivos usados para expresión inducida (por ejemplo, ácido indol acético (IAA), isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG) y similares), disponibles en el mercado. Un pH de un medio de cultivo puede estar dentro de un intervalo adecuado para cultivo de *E. coli* (pH 6 a 8).
- La selección de *E. coli* recombinante que expresa un péptido deseado (el objeto) se puede llevar a cabo como se describe más adelante. Las células cultivadas y desarrolladas en presencia de un inductor de expresión (se usó IPTG en un sistema de expresión en la presente invención) se recogen mediante centrifugación (10.000 rpm, 5 minutos), se suspenden en un volumen fijo de agua destilada, se alteran mediante sonicación en un homogeneizador tal como prensa francesa o Manton Golin y se someten a centrifugación (15.000 rpm, 15 minutos) para separación y recuperación en precipitado o sobrenadante. Se puede añadir de forma apropiada tensioactivo (por ejemplo, Triton X 100), un agente quelante (por ejemplo, EDTA), liposoma y similares a agua destilada. Una

cantidad fija de productos expresados recuperados en sobrenadante y precipitado se puede someter a electroforesis en gel de poliacrilamida SDS y después de tinción con Azul Brillante de Coomassie, se puede confirmar la expresión del objeto mediante un tamaño molecular e imagen teñida. Para confirmación (o detección) del objeto, también se puede usar un enfoque en base a reacción de antígeno-anticuerpo tal como ELISA, transferencia de Western, transferencia puntual y similares, diferentes a un enfoque en base a tamaño molecular como se ha descrito anteriormente. Todos estos enfoques se usan de forma común para detectar una proteína o polipéptido heterólogo expresado en *E. coli* y se pueden seleccionar según sea apropiado.

Para purificar el objeto a partir de *E. coli* recombinante, se puede usar una combinación de los métodos usados comúnmente en el campo de la química de proteína tal como por ejemplo centrífuga, desalado, ultrafiltración, enfoque isoeléctrico, electroforesis, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía hidrófoba, cromatografía de hidroxipatita y similares. Una cantidad de la proteína o polipéptido obtenido se puede medir con un reactivo para medición de proteína tal como un Kit de Reactivo de Ensayo de Proteína BCA (Pierce Biotechnology, Inc), kit de Ensayo de Proteína (Bio-Rad, Inc) y similares.

Para facilitar la purificación del objeto, se puede expresar en una fusión con otro polipéptido o péptido. Un vector para expresar una proteína de fusión de este tipo incluye un sistema de expresión de etiqueta His (Novagen Inc.) que permite la adición de oligohistidina, un sistema con capacidad de expresión de una proteína de fusión con etiqueta FLAG (Sigma), sistema de purificación de proteína de fusión GST (Amersham Pharmacia) que permite la producción de una proteína de fusión con glutatión S-transferasa (GST), Sistema de Purificación de Proteína MagneHis (Promega) y similares. Por ejemplo, como se ha llevado a cabo en los ejemplos de trabajo de la invención, después de la expresión de una proteína de fusión con oligohistidina, un polipéptido de interés se puede purificar específicamente con columna de afinidad de níquel (GE Healthcare Bioscience).

Los diversos péptidos obtenidos de este modo que no contienen una secuencia de aminoácidos homóloga entre A.pg-A y A.pg-C se pueden usar en medición de anticuerpo para detección de un anticuerpo inducido por vacuna de coriza infecciosa aviar o para diagnóstico serológico de pollos infectados por A.pg. Específicamente, se pueden aplicar medición de anticuerpo tal como ELISA, transferencia de Western, transferencia puntual y similares. En caso de que se tengan que manejar muchos anticuerpos, se puede usar de forma preferente ELISA con una placa de microtitulación en la cual se inmovilizan los péptidos.

Para inmovilizar un péptido en una placa de microtitulación, se puede usar un péptido que consiste en una región no homóloga en la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de A.pg-1.3 o una parte de dicho péptido. Ya que se ha establecido que aproximadamente 6 a 10 aminoácidos pueden formar un epítipo reconocible por un anticuerpo (está publicado en línea (http://www.genosys.jp/products/spots/spots_faq.html) que de 3 a 6 aminoácidos son suficientes para formar un epítipo reconocible por un anticuerpo), se puede usar un péptido que es una parte de una región no homóloga y que consiste en una secuencia de aminoácidos de 6 o más aminoácidos consecutivos en la presente invención. Para potenciar la especificidad, preferentemente un péptido que es una parte de una región no homóloga y consiste en una secuencia de aminoácidos de 10 o más aminoácidos consecutivos o más, preferentemente 20 o más aminoácidos consecutivos, puede formar un epítipo.

Más preferentemente, se pueden usar un polipéptido codificado por AΔ6b-2 # (P-AΔ6b-2 #), un polipéptido codificado por CΔ6b-1b (P-CΔ6b-1b) y un polipéptido codificado por AΔ7b-1b (P-AΔ7b-1b) y una parte de un péptido que consiste en una región no homóloga en la secuencia de aminoácidos codificada por el gen de A.pg-1.3 que puede abarcar los polipéptidos anteriores. Además, en la medida en que no se proporcione sensibilidad reducida o reacción inespecífica aumentada, que pueden interferir con la detección de un anticuerpo, también se puede usar un péptido mutado donde se introduce una mutación de aminoácido. Dos o más de estos péptidos se pueden usar en combinación según lo requiera la ocasión. Por ejemplo, cuando un agente causal de coriza infecciosa aviar se tiene que identificar, cada uno de los péptidos respectivos se puede usar preferentemente por separado, o se puede usar preferentemente por separado una mezcla de péptidos obtenidos de A.pg-A o una mezcla de péptidos obtenidos de A.pg-C. En caso de que se pretenda simplemente la epidemiología de una infección por coriza infecciosa aviar o el estudio de la eficacia de una vacuna de coriza infecciosa aviar, una mezcla de péptidos obtenidos de A.pg-A y una mezcla de péptidos obtenidos de A.pg-C se puede mezclar entre sí adicionalmente para su uso.

Los sueros inmunizados después de la vacunación se pueden obtener administrando por vía subcutánea, por vía intradérmica o por vía intraperitoneal una mezcla del péptido anterior y un adyuvante a un animal apropiado una vez a tres veces a un intervalo de 2 a 4 semanas, obteniendo sangre posteriormente a partir del animal y centrifugando la sangre (14000 rpm, 5 minutos). El adyuvante puede incluir adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, hidróxido de aluminio (por ejemplo, ImjectAlum (Pearce)) y similares.

De forma similar, los sueros de animales infectados por *Avibacterium paragallinarum* también se pueden obtener mediante centrifugación de la sangre.

Más específicamente, se puede llevar a cabo cualquiera de los formatos de ELISA. Por ejemplo, se puede añadir inicialmente una muestra (sueros inmunizados o sueros infectados por A.pg) a una placa de microtitulación con un

péptido inmovilizado y, después del lavado, se puede añadir un anticuerpo anti-pollo marcado como un anticuerpo secundario a la placa. Como alternativa, en combinación con un anticuerpo frente a un anticuerpo específico de péptido, también se puede llevar a cabo ELISA competitivo donde una muestra y un anticuerpo anti-péptido marcado (antígeno inmovilizado) se añaden simultáneamente o por separado o, en caso de que un anticuerpo anti-péptido no esté marcado, se añade un anticuerpo secundario marcado a un anticuerpo anti-péptido.

La inmovilización de un péptido en una placa de microtitulación se puede llevar a cabo dejando el péptido en reposo a una cantidad de un antígeno de 1-10 µg/ml a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) durante 30 minutos a 2 horas o a una temperatura más baja (aproximadamente 4 °C) durante 12 a 24 horas. Un reactivo bloqueante para evitar una reacción inespecífica puede incluir Block Ace (SNOW BRAND MILK PRODUCTS CO, LTD.), reactivo bloqueante para ELISA (Roche Diagnostics K.K.), una solución de albúmina sérica bovina, una solución de leche desnatada y similares se pueden seleccionar de forma apropiada. Para lavado después de cada una de las reacciones, se puede usar PBS, TBS o sus mezclas con polisorbato (Tween 20) o un conservante (azida sódica) y, para detener la reacción, se puede usar ácido sulfúrico 2 a 3 molar. Un anticuerpo secundario puede ser un anti-IgG de pollo marcado con HRP, fluorescente, RI o biotina. Por ejemplo, se puede usar un anti-IgG de pollo-HRP (Bethyl Laboratories, Inc.) disponible en el mercado. Por ejemplo, un sustrato de HRP puede incluir OPD (ortofenilenodiamina) y TMBZ (3,3',5,5'-tetrametilbendizina) donde la absorbancia se mide a 492 nm y 450 nm, respectivamente.

También se puede usar ELISA mediante sándwich de dos anticuerpos donde un anticuerpo frente a un péptido se inmoviliza inicialmente en una placa de microtitulación y el péptido se une a dicho anticuerpo. Para este ELISA, se puede usar un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal frente al péptido. Un anticuerpo policlonal se puede obtener mediante el mismo procedimiento descrito para los sueros inmunizados anteriormente. Un animal para su uso en inmunización puede incluir pollo, rata, cobaya, hámster, perro, mono y similares. Un anticuerpo monoclonal se puede obtener aislando células que producen anticuerpo tales como esplenocitos o linfocitos a partir de un animal inmunizado con células A.pg o un polipéptido y fusionando estas células con células de mieloma de acuerdo con Milstein *et al.* (Method Enzymol., 73, 3-46, 1981) para preparar hibridomas que producen un anticuerpo frente al péptido para su uso en la presente invención. También, se puede utilizar una técnica para preparar un anticuerpo con el uso de biblioteca de presentación en fago (Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual Editado por Brian K. Kay *et al.*, Antibody Engineering: A PRACTICAL APPROACH Editado por J. McCAFFERTY *et al.*, ANTIBODY ENGINEERING segunda edición editada por Carl A. K. BORREBAECK) para preparar un anticuerpo frente al péptido para su uso en la presente invención.

Un método para medir un anticuerpo anti-A.pg mediante el ELISA establecido de este modo se puede usar para detectar un anticuerpo inducido por una vacuna o infección por A.pg. La presente invención se explica con mayor detalle por medio de los siguientes Ejemplos pero no se debe interpretar que está limitada a los mismos.

Ejemplo 1

40 Preparación de gen A.pg-1.3 y fragmentos de ADN dentro de la región de dicho gen

Se prepararon bibliotecas de ADN genómico a partir de cepa 221 de A.pg-A y cepa 53-47 de A.pg-C de acuerdo con el método de Tokunaga *et al.* (Publicación de Patente japonesa N° 10-84969). En resumen, los ADN cromosómicos se extrajeron a partir de células recogidas mediante centrifugación (8.000 rpm, 20 minutos) usando el kit SepaGene (Sanko Junyaku Co., Ltd.) y se digirieron con enzima de restricción Sau3AI para preparar bibliotecas de ADN. Usando fragmentos de ADN a partir de las bibliotecas de ADN como un molde, se llevó a cabo PCR con LA Taq (TAKARA BIO Inc.) de acuerdo con el protocolo adjunto al mismo para amplificar fragmentos, donde cada uno consiste en una parte del gen A.pg-1.3. La reacción de PCR se llevó a cabo con el kit de PCR LA ver2 (TAKARA SHUZO CO, LTD.) a 96 °C durante 1 minuto; después 30 ciclos a 96 °C durante 40 segundos, a 56 °C durante 60 segundos y a 72 °C durante 120 segundos; y a 72 °C durante 10 minutos. La Figura 1 muestra la relación posicional de cada uno de los fragmentos de ADN. La amplificación de cada uno de los fragmentos de ADN y los cebadores usados para este fin se muestra en la Tabla 1 más adelante. Cada uno de los cebadores se añadió con una secuencia para reconocimiento mediante la enzima de restricción.

Tabla 1

Fragmento de ADN	Cebador 5'	Cebador 3'
AΔ6b-1b	5'AΔ6b-1b-P (SEC ID N°: 5)	3'AΔ6b-1b-P (SEC ID N°: 6)
AΔ3-0	5'AΔ3-0-P (SEC ID N°: 7)	3'AΔ3-0-P (SEC ID N°: 8)
AΔ5-0	5'AΔ5-0-P (SEC ID N°: 9)	3'AΔ5-0-P (SEC ID N°: 10)
AΔ5-1	5'AΔ5-1-P (SEC ID N°: 11)	3'AΔ5-1-P (SEC ID N°: 12)
CΔ6b-1b	5'CΔ6b-1b-P (SEC ID N°: 13)	3'CΔ6b-1b-P (SEC ID N°: 14)
CΔ5-1	5'CΔ5-1-P (SEC ID N°: 15)	3'CΔ5-1-P (SEC ID N°: 16)
CΔ6-0	5'CΔ6-0-P (SEC ID N°: 17)	3'CΔ6-0-P (SEC ID N°: 18)
AΔ6b-2 #	5'AΔ6b-2 #-P (SEC ID N°: 19)	3'AΔ6b-2 #-P (SEC ID N°: 20)

Fragmento de ADN	Cebador 5'	Cebador 3'
AΔ7b-1b	5'AΔ7b-1b-P (SEC ID N°: 21)	3'AΔ7b-1b-P (SEC ID N°: 22)

Ejemplo 2

Expresión de cada uno de los fragmentos de ADN

5 Cada uno de los fragmentos de ADN obtenidos en el Ejemplo 1 se digirió con enzimas de restricción adecuadas y después de separación en electroforesis en agarosa al 0,8% los fragmentos amplificados se eluyeron y recuperaron con kit Quantum Prep Freeze N Squeeze DNA Gel Extraction Spin Co. Los fragmentos obtenidos se ligaron en el plásmido pQE30 (QIAGEN: 6 secuencias de etiqueta His están presentes inmediatamente cadena abajo del codón de inicio) o pET22b, que se ha digerido con las mismas enzimas de restricción mencionadas anteriormente y el extremo 5' del cual se ha desfosforilado. Los plásmidos resultantes se usaron para transformar cepa JM109 de *E. coli*. *E. coli* que comprende los fragmentos amplificados se cultivó durante una noche en medio Circle Grow (Funakoshi Co., Ltd.), complementado con ampicilina y al día siguiente se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM para cultivo adicional durante 2,5 horas. Después de centrifugación (10.000 rpm, 5 minutos), el sobrenadante se descartó y el precipitado se suspendió en una cantidad de 1/10 con relación al cultivo de Tampón de Lisis A (orina 8 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) para disolver las células. Después de centrifugación (15.000 rpm, 15 minutos) se recogió el sobrenadante del lisado celular. El sobrenadante del lisado celular recogido se mezcló con 1 ml de gel de agarosa Ni-NTA para absorción al gel y se cargó en una columna fijada con un tapón inferior. Después de lavado de la columna, se recogió una fracción eluida con un eluido (orina 8 M, NaH₂PO₄ 100 mM, Tris 10 mM, imidazol 100 mM, pH 8,0) y se llevó a cabo electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE). Entre los fragmentos obtenidos de A.pg-A y A.pg-C, la Figura 2 muestra el patrón de electroforesis de los productos de expresión AΔ6b-1b y CΔ6b-1b que se usaron para antígeno de ELISA.

Ejemplo 3

Preparación de sueros de pollo anti-polipéptido

El polipéptido P-AΔ5-1 obtenido en el Ejemplo 2 se diluyó con PBS a 10 µg/dosis y se añadió con hidróxido de aluminio a una concentración final del 20%. La mezcla resultante se administró por vía subcutánea a pollos SPF de 5 semanas de edad en el cuello dos veces a un intervalo de 3 semanas para inmunización. Para los otros polipéptidos P-AΔ3-0, P-AΔ5-0, P-CΔ5-1 y P-CΔ6-0, los mismos se diluyeron con PBS hasta 10 µg/dosis y se emulsionaron con un adyuvante oleoso (0,01 g de antígeno, 0,001 ml o menos de formalina, 0,01 ml de Polisorbato 80, 0,04 ml de sesquioleato de sorbitán, 0,36 ml de parafina líquida ligera, el tampón fosfato restante por dosis (0,5 ml)) y la mezcla resultante se administró una vez por vía subcutánea a pollos SPF de 5 semanas de edad en el cuello. A las 9-11 semanas de edad se tomaron muestras de sangre de los pollos para dar sueros inmunizados frente a cada uno de los polipéptidos.

Ejemplo 4

Confirmación de reacción de cada polipéptido con sueros inmunizados mediante ELISA

Los polipéptidos P-AΔ6b-1b, P-Ad6b-2#, P-AΔ7b-1b y P-CΔ6b-1b obtenidos en el Ejemplo 2 se diluyeron con tampón de bicarbonato 50 mM hasta 1,0-2,5 µg/ml y cada 100 µl de la solución se añadieron a placas de 96 pocillos para inmovilización. Después de absorción a temperatura ambiente durante 1 hora, la solución de reacción se descartó y la placa se lavó con 200 µl de PBS-T (hidrogenofosfato disódico 8,1 mM, dihidrogenofosfato potásico 1,5 mM, cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, Tween 20 al 0,05%) y se añadieron 200 µl de PBS-T complementado con leche desnatada al 5% para bloqueo. La solución de bloqueo se descartó. El suero se diluyó con PBS-T complementado con leche desnatada al 1% hasta 50 a 100 veces y cada 100 µl de la solución se añadieron a cada pocillo para reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eliminar la solución de reacción, la placa se lavó con PBS-T tres veces. Un anticuerpo anti-IgG de pollo marcado con HRP se diluyó con PBS-T complementado con leche desnatada al 1% hasta 10.000 – 20.000 veces y cada 100 µl de la solución se añadieron a cada pocillo para reacción a temperatura ambiente durante 1 hora en la oscuridad. Después de eliminar la solución de reacción, la placa se lavó con PBS-T tres veces. Cada 100 µl de una solución de sustrato (citrato 100 mM, hidrogenofosfato disódico 200 mM, ortofenilendiamina al 0,004%, peróxido de hidrógeno) se añadieron para reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos. Cada 100 µl de ácido sulfúrico 3 M se añadieron para detener la reacción. La absorbancia a la longitud de onda de 492 nm se midió con un lector de placa de 96 pocillos (Molecular Devices Japan). Los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Sueros de pollo	Antígeno inmovilizado			
	P-AΔb-1b	P-AΔ6b-2#	P-AΔ7b-1b	P-CΔ6b-1b
Suero inmunizado con P-AΔ5-1	2,953 ± 0,032	1,642 ± 0,288	1,401 ± 0,136	0,045 ± 0,054

Sueros de pollo	Antígeno inmovilizado			
	P-AΔb-1b	P-AΔ6b-2#	P-AΔ7b-1b	P-CΔ6b-1b
Suero inmunizado con P-AΔ5-0	2,914 ± 0,030	2,697 ± 0,124	1,598 ± 0,261	0,043 ± 0,071
Suero inmunizado con P-AΔ3-0	2,949 ± 0,041	2,742 ± 0,157	1,924 ± 0,193	0,043 ± 0,037
Suero inmunizado con P-CΔ5-1	0,598 ± 0,515	0,032 ± 0,027	0,072 ± 0,015	1,153 ± 0,655
Suero inmunizado con P-CΔ6-0	1,187 ± 0,798	0,074 ± 0,018	0,058 ± 0,019	2,003 ± 0,506
Suero infectado con A.pg-A	1,068 ± 1,509	0,529 ± 0,708	0,648 ± 0,061	0,016 ± 0,004
Suero infectado con A.pg-A ^{*1}	NR ^{*2}	0,417 ± 0,061	NR	0,123 ± 0,007
Suero infectado con A.pg-C ^{*1}	NR	0,119 ± 0,009	NR	0,286 ± 0,067

*1: Medido como se describe en el Ejemplo 5 siempre que el suero se hubiera diluido hasta 100 veces y el anticuerpo anti-IgG de pollo marcado con HRP se hubiera diluido a 50.000 veces
*2: No realizado

El polipéptido P-AΔ6b-1b que comprende una secuencia de aminoácidos homóloga entre la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-271 de SEC ID N°: 1 de la Región 2 de A.pg-A y la secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 38-68 de SEC ID N°: 2 de la Región 2 de A.pg-C (entre 31 restos de aminoácidos, 30 restos de aminoácidos son comunes; consúltese la Figura 3) fue reactivo con cualquiera de los sueros inmunizados con los polipéptidos (P-AΔ3-0, P-AΔ5-1, P-AΔ5-0, P-CΔ5-1 y P-CΔ6-0) que comprenden la Región 2. Por otro lado, los polipéptidos (P-A06b-2#, P-AΔ7b-1b y P-CΔ6b-1b) que no comprenden la secuencia de aminoácidos homóloga como se ha descrito anteriormente fueron reactivos de una manera específica de A.pg-A o A.pg-C. Los polipéptidos P-AΔ-2 y P-AΔ7b-1b también se unieron a sueros infectados con A.pg-A.

Ejemplo 5

Correlación entre sueros vacunados y protección mediante ELISA

Una vacuna de adyuvante oleoso disponible en el mercado con una célula inactivada (Oilvacks 7; Juridical Foundation The Chemo-Therapeutic Research Institute) y una vacuna de la misma composición que Oilvacks 7 con la excepción de que el antígeno A.pg (A.pg-A y A.pg-C inactivado) se reemplazó con los polipéptidos AΔ5-1 y CΔ5-1 obtenidos en el Ejemplo 2, se prepararon y se inyectaron por vía subcutánea una vez a pollos SPF de 5 semanas de edad en el cuello. Para la vacuna disponible en el mercado, además de 1 dosis, también se administraron sus diluciones a 1/100 y 1/1.000. Para los polipéptidos, se administró una vacuna que contenía una mezcla de polipéptidos obtenidos de A.pg-A y A.pg-C, cada uno diluido a 3, 0,3 y 0,03 μg/pollo. Después de que se hubo extraído sangre a partir de los pollos a las 9 semanas de edad, se administraron por vía intranasal 0,2 ml de una solución de cepa 211 de A.pg-A ($1,5 \times 10^9$ UFC/ml) o una cepa 53-47 de A.pg-C ($5,0 \times 10^8$ UFC/ml) a los pollos y se observaron los síntomas clínicos tales como inflamación de la cara, secreción nasal y epífora durante 1 semana.

Los sueros obtenidos se sometieron a determinación de valor de ELISA como se describe más adelante. Los polipéptidos P-AΔ6b-2# y P-CΔ6b-1b obtenidos en el Ejemplo 2 se diluyeron con tampón de bicarbonato 50 mM a 1,0 μg/ml y cada 50 μl de la solución se añadieron a placas de 96 pocillos para inmovilización. Después de la absorción a 4 °C durante una noche, la solución de reacción se descartó y la placa se lavó con 300 μl de PBS-T (hidrogenofosfato disódico 8,1 mM d, dihidrogenofosfato potásico 1,5 mM, cloruro de sodio 137 mM, cloruro de potasio 2,7 mM, Tween 20 al 0,05%) y se añadieron 300 μl de PBS-T complementado con leche desnatada al 5% para bloqueo. La solución de bloqueo se descartó. El suero se diluyó con PBS-T complementado con leche desnatada al 5% hasta 1.000 veces y cada 50 μl de la solución se añadieron a cada pocillo para reacción a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de eliminar la solución de reacción, la placa se lavó con PBS-T tres veces. Un anticuerpo anti-IgG de pollo marcado con HRP se diluyó con PBS-T complementado con leche desnatada al 5% a 25.000 veces y cada 50 μl de la solución se añadieron a cada pocillo para reacción a temperatura ambiente durante 30 minutos en la oscuridad. Después de eliminar la solución de reacción, la placa se lavó con PBS-T tres veces. Cada 100 μl de una solución de sustrato (TMB + sustrato-cromógeno; DAKO Corp.) se añadieron para reacción a temperatura ambiente durante 15 minutos. Cada 100 μl de ácido sulfúrico 3 M se añadieron para detener la reacción. La absorbancia a la longitud de onda de 450 nm se midió con un lector de placa de 96 pocillos (Molecular Devices Japan).

Como se muestra en las Figuras. 4 y 5, para los pollos expuestos a A.pg-A o A.pg-C, aquellos pollos que mostraban menos de 0,1 de valor de ELISA en los sueros antes de la exposición sufrían de la enfermedad para confirmar la infección. Por otra parte, ningún pollo que mostrara más de 0,1 de medición de ELISA en los sueros antes de la exposición sufría de la enfermedad. A partir de estos resultados, el uso del sistema de ELISA de la presente invención permitiría la estimación de un nivel de protección de un anticuerpo de vacuna.

Aplicabilidad industrial

5 El método para detección de la presente invención se puede usar para ensayar la condición inmune de pollos inmunizados con una vacuna que consiste en un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos como se usa en la presente invención. También, el método para detección de la presente invención se puede usar para estudiar un mecanismo de aparición de enfermedad o epidemiología midiendo sueros a partir de pollos que sufren de coriza infecciosa aviar a través de infección con A.pg.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Juridical Foundation The Chemo-Sero-Therapeutic Research Institute
<120> Método y kit para la detección de anticuerpo anti-*Avibacterium paragallinarum*
<130> 668778
<150> JP 2008-29589
15 <151> 08-02-2008
<160> 22
<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
20 <211> 446
<212> PRT
<213> *Avibacterium paragallinarum*

<400> 1
25

ES 2 437 148 T3

Lys Gly Ile Tyr Leu Lys Ala Asp Gln Asn Asp Pro Thr Gly Asn Gln
 1 5 10 15
 Gly Gln Lys Val Glu Leu Gly Asn Ala Ile Thr Leu Ser Ala Thr Asn
 20 25 30
 Gln Trp Ala Asn Asn Gly Val Asn Tyr Lys Thr Asn Asn Leu Thr Thr
 35 40 45
 Tyr Asn Ser Gln Asn Gly Thr Ile Leu Phe Gly Met Arg Glu Asp Pro
 50 55 60
 Ser Val Lys Gln Ile Thr Ala Gly Thr Tyr Asn Thr Thr Gly Asp Ala
 65 70 75 80
 Asn Asn Lys Asn Gln Leu Asn Asn Thr Leu Gln Gln Thr Thr Leu Glu
 85 90 95
 Ala Thr Gly Ile Thr Ser Ser Val Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gly Phe
 100 105 110
 Ser Leu Gly Ala Asp Ser Val Thr Phe Ser Lys Gly Gly Ala Gly Thr
 115 120 125
 Val Lys Leu Ser Gly Val Ser Asp Ala Thr Ala Asp Thr Asp Ala Ala
 130 135 140
 Thr Leu Lys Gln Val Lys Glu Tyr Arg Thr Thr Leu Val Gly Asp Asn
 145 150 155 160
 Asp Ile Thr Ala Ala Asp Arg Ser Gly Gly Thr Ser Asn Gly Ile Thr
 165 170 175
 Tyr Asn Leu Ser Leu Asn Lys Gly Thr Val Ser Ala Thr Glu Glu Lys
 180 185 190
 Val Val Ser Gly Lys Thr Val Tyr Glu Ala Ile Arg Asn Ala Ile Thr
 195 200 205
 Gly Asn Ile Phe Thr Ile Gly Leu Asp Asp Thr Thr Leu Asn Lys Ile
 210 215 220
 Asn Asn Pro Ala Asp Gln Asp Leu Ser Asn Leu Ser Glu Ser Gly Lys
 225 230 235 240
 Asn Ala Ile Thr Gly Leu Val Asp Val Val Lys Lys Thr Asn Ser Pro
 245 250 255
 Ile Thr Val Glu Pro Ser Thr Asp Ser Asn Lys Lys Lys Thr Phe Thr
 260 265 270
 Val Gly Val Asp Phe Thr Asp Thr Ile Thr Glu Gly Asp Ala Thr Asp
 275 280 285
 Asp Lys Lys Leu Thr Thr Ser Lys Ser Val Glu Ser Tyr Val Thr Asn
 290 295 300
 Lys Leu Ala Asn Phe Ser Thr Asp Ile Leu Leu Ser Asp Gly Arg Ser
 305 310 315 320
 Gly Asn Ala Thr Thr Ala Asn Asp Gly Val Gly Lys Arg Arg Leu Ser
 325 330 335
 Asp Gly Phe Thr Ile Lys Ser Glu Asn Phe Thr Leu Gly Ser Lys Gln
 340 345 350
 Tyr Asn Gly Ser Asp Ser Leu Gly Val Met Tyr Asp Asp Gln Asn Gly
 355 360 365

 Val Phe Lys Leu Ser Leu Asn Met Thr Ala Leu Thr Thr Ser Leu Ala
 370 375 380
 Asn Thr Phe Ala Lys Leu Asp Ala Ser Asn Leu Thr Asp Asp Ser Asn
 385 390 395 400
 Lys Glu Lys Trp Arg Thr Ala Leu Asn Val Tyr Ser Lys Thr Glu Val
 405 410 415
 Asp Ala Glu Ile Gln Lys Ser Lys Val Thr Leu Thr Pro Asp Ser Gly
 420 425 430
 Leu Ile Phe Ala Thr Lys Gln Ala Gly Ser Gly Asn Asn Ala
 435 440 445

ES 2 437 148 T3

<210> 2
 <211> 453
 <212> PRT
 <213> *Avibacterium paragallinarum*

5

<400> 2

Lys Leu Ile Ser Leu Ser Ala Thr Glu Glu Glu Glu Val Val Ser Gly
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Tyr Asp Ala Leu Lys Gly Ala Lys Pro Thr Val Ser Ala
 20 25 30
 Glu Ala Asn Lys Gly Ile Thr Gly Leu Val Asp Val Val Lys Lys Ala
 35 40 45
 Asn Ser Pro Ile Thr Val Glu Pro Ser Thr Asp Asn Lys Lys Lys
 50 55 60
 Thr Phe Thr Val Gly Leu Met Lys Asp Ile Glu Gly Val Asn Ser Ile
 65 70 75 80
 Thr Phe Asp Lys Ser Gly Gln Asp Leu Asn Gln Val Thr Gly Arg Met
 85 90 95
 Ser Ser Ala Gly Leu Thr Phe Lys Lys Gly Asp Thr Thr Asn Gly Ser
 100 105 110
 Thr Thr Thr Phe Ala Glu Asp Gly Leu Thr Ile Asp Ser Thr Thr Asn
 115 120 125
 Ser Ala Gln Thr Asn Leu Val Lys Val Ser Arg Asp Gly Phe Ser Val
 130 135 140
 Lys Asn Gly Ser Asp Glu Ser Lys Leu Ala Ser Thr Lys Leu Ser Ile
 145 150 155 160
 Gly Ala Glu Asn Ala Glu His Val Glu Val Thr Lys Ser Gly Ile Ala
 165 170 175
 Leu Lys Ala Asp Asn Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ile Thr Leu Ala Gln
 180 185 190
 Asp Ala Ile Thr Leu Ala Gly Asn Ala Thr Gly Thr Ala Ile Lys Leu
 195 200 205
 Thr Gly Val Ala Asp Gly Asn Ile Thr Val Asn Ser Lys Asp Ala Val
 210 215 220
 Asn Gly Gly Gln Leu Arg Thr Leu Leu Gly Val Asp Ser Gly Ala Lys
 225 230 235 240
 Ile Gly Gly Thr Glu Lys Thr Thr Ile Ser Glu Ala Ile Ser Asp Val
 245 250 255
 Lys Gln Ala Leu Thr Asp Ala Thr Leu Ala Tyr Lys Ala Asp Asn Lys
 260 265 270
 Asn Gly Lys Thr Val Lys Leu Thr Asp Gly Leu Asn Phe Thr Ser Thr
 275 280 285
 Thr Asn Ile Asp Ala Ser Val Glu Asp Asn Gly Val Val Lys Phe Thr
 290 295 300
 Leu Lys Asp Lys Leu Thr Gly Leu Lys Thr Ile Ala Thr Glu Ser Leu
 305 310 315 320
 Asn Ala Ser Gln Asn Ile Ile Ala Gly Gly Thr Val Thr Val Gly Gly
 325 330 335
 Glu Thr Glu Gly Ile Val Leu Thr Lys Ser Gly Ser Gly Asn Asp Arg

ES 2 437 148 T3

```

                340                345                350
    Thr Leu Ser Leu Ser Gly Ala Gly Asn Ala Ala Thr Asp Gly Ile Lys
                355                360                365
    Val Ser Gly Val Lys Ala Gly Thr Ala Asp Thr Asp Ala Val Asn Lys
                370                375                380
    Gly Gln Leu Asp Lys Leu Phe Lys Ala Ile Asn Asp Ala Leu Gly Thr
    385                390                395                400
    Thr Asp Leu Ala Val Thr Lys Asn Pro Asn Gln Thr Ser Ile Phe Asn
                405                410                415
    Pro Ile Asn Gly Thr Ala Pro Thr Thr Phe Lys Asp Ala Val Asp Lys
                420                425                430
    Leu Thr Thr Ala Val Asn Thr Gly Trp Gly Ser Lys Val Gly Ile Leu
                435                440                445
    Ala Thr Gly Ile Asp
                450

```

<210> 3
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> *Avibacterium paragallinarum*

5

```

<400> 3
aaaggatct accttaaagc ggatcagaat gatccaacag gaaatcaagg tcagaaagtg      60
gaacttggtg atgcaataac gctttcggca acaaatcaat gggcgaataa cggcgtaaat      120
tataaaacga acaatttaac cacttataat tcacaaaatg gcacgatttt atttggaatg      180
cgtgaagatc caagtgtaaa acaaattaca gcgggaaacct ataatacaac gggatgatgcg      240
aacaataaaa atcaactaaa taatacactt caacaaacca cgcttgaagc aactgggatc      300
accagtagcg taggttcaac taactacgct ggcttttagct taggggcaga cagcgtcacc      360
ttctcgaag gtggagctgg cacggtgaaa ctttctggcg taagcgatgc cacagccgac      420
accgacgctg ccaactctaaa acaagtgaaa gaataccgca caacattagt gggatgataat      480
gacatcaccg cagcagatcg tagtggcggc acaagcaatg gcattacctt caacttaagc      540
cttaataaag gtacggtttc ggcaacagaa gaaaaagtgg tgtcagggaa aactgtctat      600
gaagccatta gaaatgccat cacaggcaac atcttcacaa ttggcttaga cgataccacc      660
ttgaacaaaa tcaacaatcc cgcggatcaa gatctttcaa acctcagtga aagtggcaaa      720
aatgccatta cgggcttagt ggatgtggtg aaaaaaacia attcaccgat cacagttgag      780
ccttctaccg atagcaacia gaaaaaaacc ttcactgtag gcgtggattt caccgatacc      840
attacggaag gtgacgcaac ggatgataaa aaactgacga cttcaaaatc cgttgaaagc      900
tatgtcacia acaaactcgc gaacttctct acagatatct tgttatcgga tgggcgttct      960
ggtaacgcaa caacggcaaa tgatgggggt ggtaaacgct gtttgtctga tggctttacg     1020
atcaaatctg aaaactttac gctaggttca aaacaatata atggctctga tagcttaggg     1080
gtaatgtatg acgatcaaaa tggggtcttt aaattaagcc taaatatgac cgcacttacc     1140
acttcattgg ctaatacttt cgcaagttg gatgcctcta accttactga tgatagcaat     1200
aaagagaaat ggcgtactgc gttgaatgtg tattcaaaaa cagaagtaga tgcagaaatt     1260
caaaaatcca aggtaacact cacaccgat tcgggtttga tctttgcgac caaacaagct     1320
gggagtggta ataacgca

```

10

<210> 4
 <211> 1359
 <212> ADN
 <213> *Avibacterium paragallinarum*

15

```

<400> 4
aaattgatct cgctttcggc aacagaagaa gaagaagtgg tgtcagggga agctgtctat      60
gatgcactta aagggtgcaaa accaacgggt tcagcagaag ccaacaaagg cattactggc      120
ttggtggatg tgggtgaaaa agcaaattca ccgatcacag ttgagccttc taccgataac      180
aacaagaaaa aaaccttcac tgtcggctta atgaaagaca ttgaaggggt aaacagcatt      240
acctttgata agtcagggca agatctaaat caagttacgg gcagaatgag cagtgcgggt      300
ttaaccttca aaaaaggcga cacaacaat ggttcaacca ccacttttgc agaagatggc      360
ttaaccattg atagcacaac aaattctgct caaacaact tagtgaaagt aagtcgtgat      420

```


ES 2 437 148 T3

ggcttctcgg	tgaaaaatgg	cagcgatgaa	agcaaattag	cctcgacaaa	attatctatc	480
ggtgcgga	atgcagaaca	cgttgaagta	actaaatcgg	gcatagcctt	aaaagcggat	540
aacacctcgg	ataaatctag	catcacctta	gccccagatg	cgattactct	tgcggggaac	600
gcaaccggaa	cggcgattaa	attgactggt	ggtgcagatg	gcaacattac	ggtaaattca	660
aaagatgcgg	taaatggggg	gcagttgcgt	accttattag	gggttgatag	cggggctaaa	720
attggcggta	ctgagaaaac	aacgatcagt	gaagccattt	ctgatgtgaa	gcaagctctt	780
accgatgcga	cattggcata	taaagcggac	aataaaaacg	gtaaaacagt	taaattgact	840
gacggattga	atcttactag	cacgaccaat	attgatgctt	cagtggaaga	taacgggtgtg	900
gtgaaattca	ccttaaaaga	taaattaaca	ggcttaaaaa	ctatcgcaac	tgaatctttg	960
aatgcttctc	aaaatatcat	cgctggcggg	acggtaacag	tgggcggcga	gacagagggc	1020
attgtgctaa	caaaatctgg	ctcaggaaat	gaccgcactt	tatctttatc	tggtgcaggc	1080
aatgcagcaa	cagatggcat	taaagtctct	ggcgtgaaaag	cagggacggc	agacaccgat	1140
gcggtgaata	aaggtcagtt	agataaaact	tttaaagcga	tcaatgacgc	attaggcaca	1200
acagatttag	cggtaaccaa	aaatccaaat	caaacctcta	tctttaatcc	gataaacggc	1260
acggctccaa	ccacctttaa	agacgcggtg	gataaattaa	ccaccgctgt	gaatacaggt	1320
tgggatcaa	aggtaggtat	tttggaaca	ggtattgat			1359

5 <210> 5
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 5
 cgcgatcgg atcagaatga tccaacagga aatcaa 36

15 <210> 6
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cebador

<400> 6

25 acgctgcgac gttattacca ctcccagctt gtttg 35

30 <210> 7
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

35 <400> 7
 catgccatgg tttatgatga aactactoga gccttt 36

40 <210> 8
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial

45 <220>
 <223> cebador

<400> 8
 cgcgatcct taaggctaaa aaaagctaaa tccaacactc at 42

ES 2 437 148 T3

<210> 9
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 5
 <220>
 <223> cebador
 <400> 9
 10
 catgccatgg atggcacaat tacattaca aatatt 36
 <210> 10
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 15
 <220>
 <223> cebador
 20
 <400> 10
 cgcgatcct taaggctaaa aaaagctaaa tccaacactc at 42
 25
 <210> 11
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 30
 <220>
 <223> cebador
 <400> 11
 35
 catgccatgg atggcacaat tacattaca aatatt 36
 <210> 12
 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Artificial
 40
 <220>
 <223> cebador
 45
 <400> 12
 acgctcgac acctgagtg ctatgctg taggtgc 37
 50
 <210> 13
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 55
 <220>
 <223> cebador
 <400> 13
 cgcgatccg gcttaatgaa agacattgaa ggggtaaac 39
 60
 <210> 14
 <211> 40
 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cebador

 <400> 14
 5 acgcgctgac aatacctgtt gccaaaatac ctaccttga 40

 <210> 15
 <211> 36
 10 <212> ADN
 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 15
 <400> 15

 catgccatgg atggcacaat tacatttaca aatatt 36
 20
 <210> 16
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Artificial
 25
 <220>
 <223> cebador

 <400> 16

 cgcggatccc ataccttgag tgctagatgc thtaggtgc 39
 30

 <210> 17
 <211> 32
 <212> ADN
 35 <213> Artificial

 <220>
 <223> cebador
 40
 <400> 17

 catgccatgg atgcgattaa taatgttctc ac 32
 45
 <210> 18
 <211> 42
 <212> ADN
 <213> Artificial
 50
 <220>
 <223> cebador

 <400> 18

 cgcggatcct taaggctaaa aaaagctaaa tccaacactc at 42
 55

 <210> 19
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Artificial
 60
 <220>
 <223> cebador

ES 2 437 148 T3

<400> 19
cgcggatccg atcagaatga tccaacagga aatcaa 36

5 <210> 20
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

10 <220>
<223> cebador

<400> 20
acgcgctgac actgaggttt gaaagatctt gat 33

15 <210> 21
<211> 33
<212> ADN
<213> Artificial

20 <220>
<223> cebador

25 <400> 21
cgcggatccg gcgtggattt caccgatacc att 33

30 <210> 22
<211> 35
<212> ADN
<213> Artificial

35 <220>
<223> cebador

<400> 22
acgcgctgac gttattacca ctcccagctt gtttg 35

40

REIVINDICACIONES

1. Un método para la detección de un anticuerpo frente a serotipo A o serotipo C de *Avibacterium paragallinarum* **caracterizado por que** dicho método comprende medición de anticuerpo sometiendo a reacción al menos un
5 antígeno de péptido A o Péptido B más adelante con una muestra:

Péptido A:

que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que consiste en
10 una cadena peptídica de 6 o más restos de aminoácidos y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1 donde dicho péptido detecta anticuerpos específicos de serotipo A;

Péptido B:

que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, que consiste en
15 una cadena peptídica de 6 o más restos de aminoácidos y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 38-68 de SEC ID N°: 2 donde dicho péptido detecta anticuerpos específicos de serotipo C.

2. Un kit para medición de un anticuerpo frente a serotipo A o serotipo C de *Avibacterium paragallinarum* **caracterizado por que** al menos uno de Péptido A o Péptido B más adelante se usa como un antígeno:

Péptido A:

20 que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que consiste en una cadena peptídica de 6 o más restos de aminoácidos y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1 donde dicho péptido detecta anticuerpos específicos de serotipo A;

Péptido B:

25 que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, que consiste en una cadena peptídica de 6 o más restos de aminoácidos y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 38-68 de SEC ID N°: 2 donde dicho péptido detecta anticuerpos específicos de serotipo C.

3. El método para detección de la reivindicación 1 o el kit para la medición de un anticuerpo de la reivindicación 2
30 donde el péptido A o el péptido B es una cadena peptídica de 10 o más restos de aminoácidos.

4. El método para detección de la reivindicación 1 o el kit para la medición de un anticuerpo de la reivindicación 2
donde el péptido A o el péptido B es una cadena peptídica de 20 o más restos de aminoácidos

5. El método para detección de la reivindicación 1 o el kit para la medición de un anticuerpo de la reivindicación 2
35 donde el Péptido A o Péptido B es una cadena peptídica como se indica a continuación:

Péptido A:

40 que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 8-236 de SEC ID N°: 1 y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1;

Péptido B:

45 que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 2, que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 69-452 de SEC ID N°: 2 y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 38-68 de SEC ID N°: 2;

6. El método para la detección de la reivindicación 1 o el kit para la medición de un anticuerpo de la reivindicación 2
donde el Péptido A o el Péptido B es una cadena peptídica como se indica a continuación:

Péptido A:

50 que es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 8-236 de SEC ID N°: 1;

Péptido B:

que es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 69-452 de SEC ID N°:
2.

55 7. El método para la detección o el kit para la medición de un anticuerpo de la reivindicación 5 donde el Péptido A es una cadena peptídica como se indica a continuación:

Péptido A:

60 que es un péptido que consiste en una parte de la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, que comprende una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 274-445 de SEC ID N°: 1 y no incluye una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 243-273 de SEC ID N°: 1.

8. El método para la detección o el kit para la medición de un anticuerpo de la reivindicación 6 donde el Péptido A es
una cadena peptídica como se indica a continuación:

65

Péptido A:

que es un péptido que consiste en una secuencia de aminoácidos de los aminoácidos N° 274-445 de SEC ID N°: 1.

- 5 9. El método para la detección de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 8 o el kit para la medición de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8 donde el Péptido A o el Péptido B es un péptido que tiene una secuencia de aminoácidos donde 1 o varios restos de aminoácidos en el mismo se han suprimido, añadido o sustituido, donde dicho péptido A detecta anticuerpos específicos de serotipo A y dicho péptido B detecta anticuerpos específicos de serotipo C.
- 10 10. El método para la detección de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 9 o el kit para la medición de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9 donde la medición de anticuerpo se selecciona entre el grupo que consiste en ELISA, transferencia de Western y transferencia puntual.
- 15 11. El método para la detección de una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 3 a 10 o el kit para la medición de un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, donde la muestra es sueros de pollos infectados con *Avibacterium paragallinarum* o sueros de pollos a los que se ha administrado una vacuna de *Avibacterium paragallinarum*.

Fig. 1

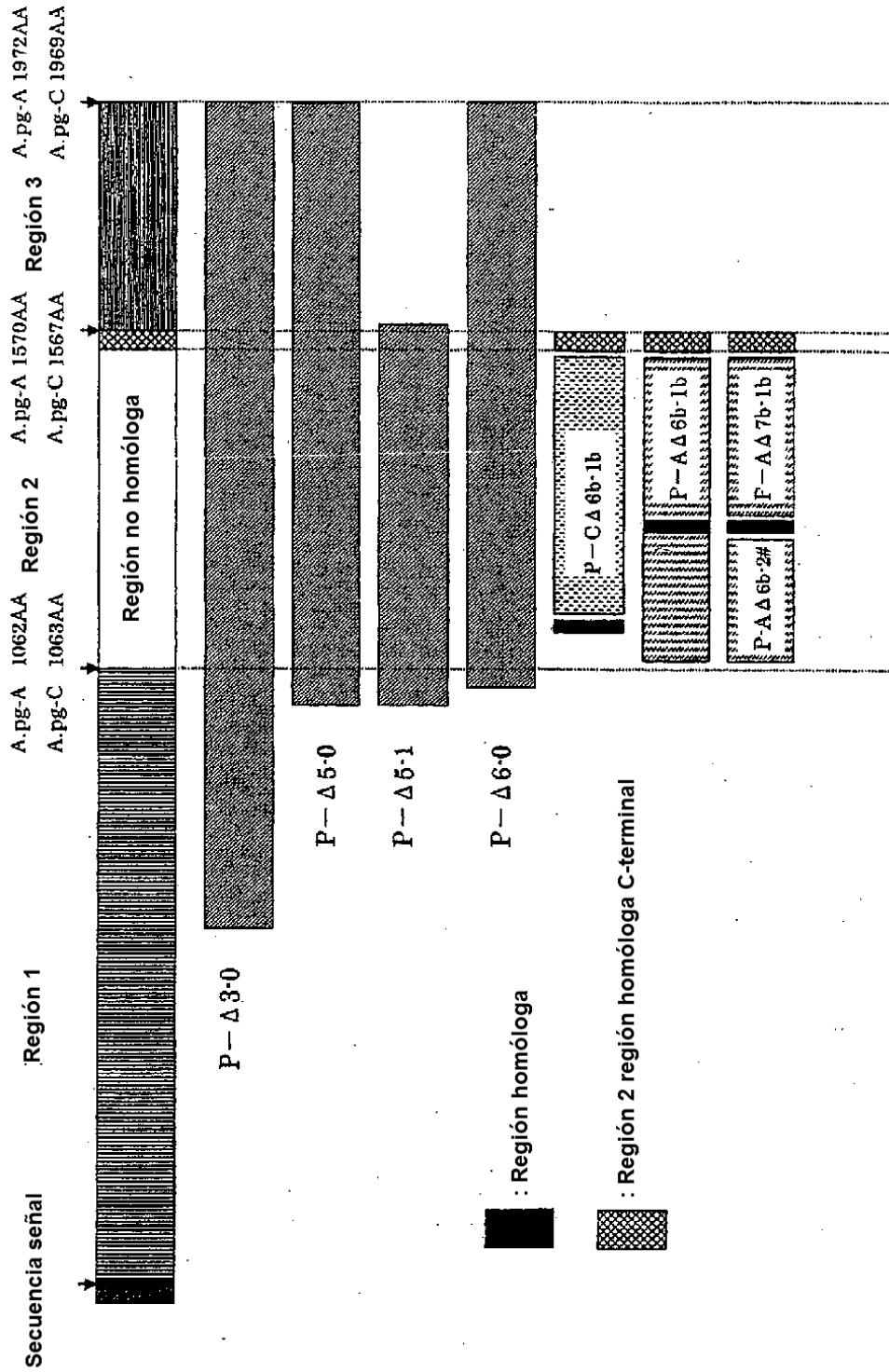


Fig. 2

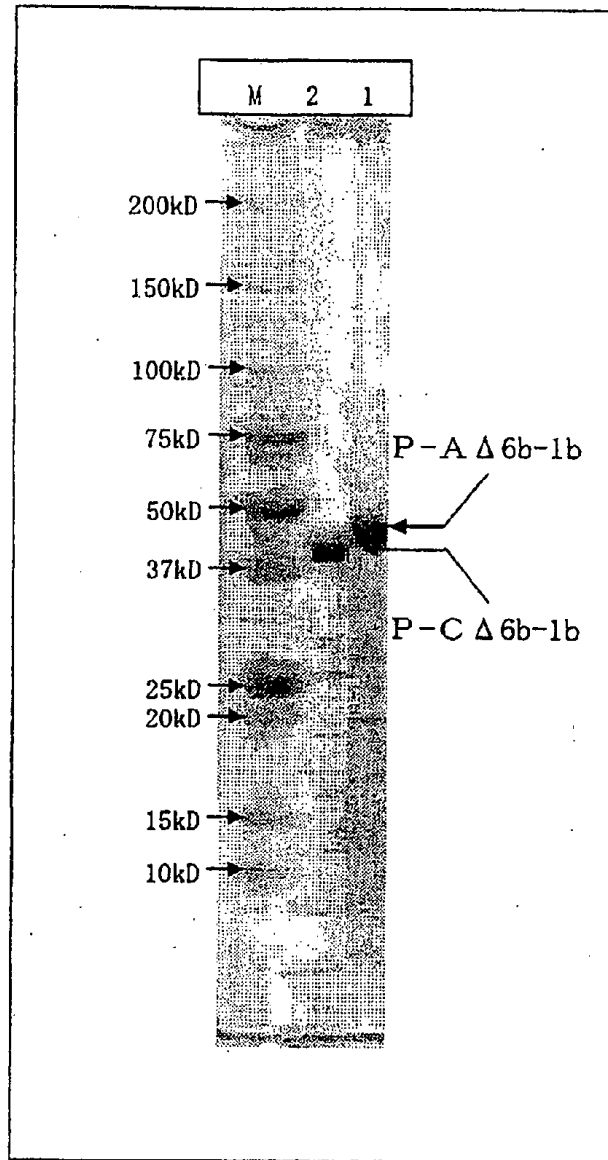


Fig. 3

A.pg-A 1 3 0 4 AA~1 3 3 4 AA (SEC ID N°: 1 2 4 3 AA~2 7 3 AA)

ITGLVDVVKKTNSPITVEPSTDSENKKKTFTV

A.pg-C 1 1 0 0 AA~1 1 3 0 AA (SEC ID N°: 2 3 8 AA~6 8 AA)

ITGLVDVVKKANSPITVEPSTDNENKKKTFTV

Fig. 4

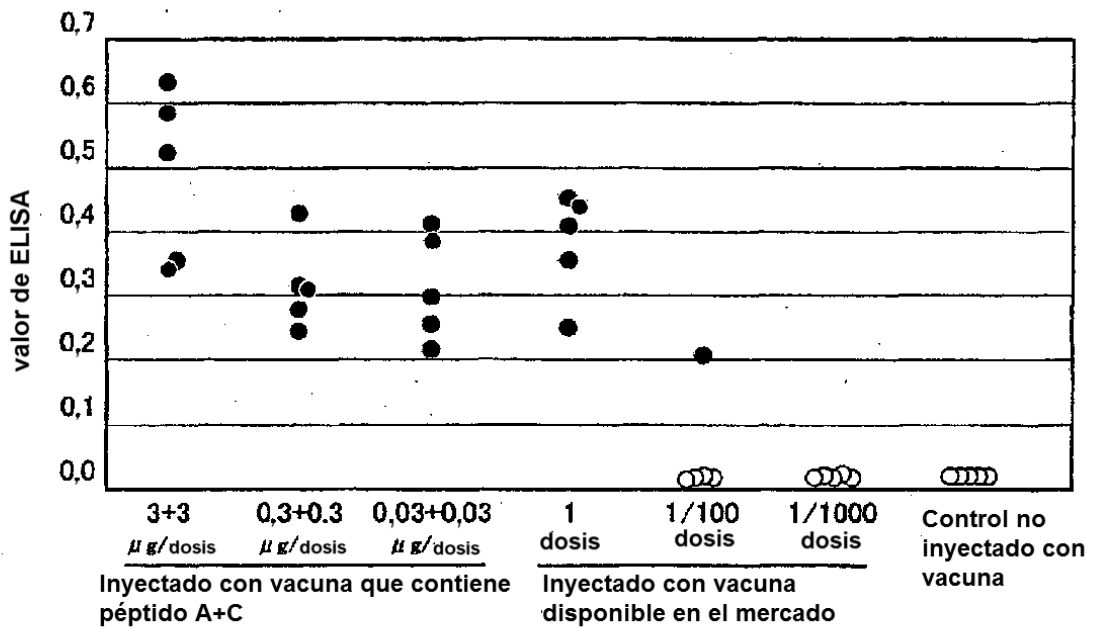


Fig. 5

