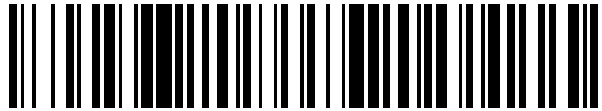


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 362**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/70**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.01.2011 E 11701887 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2015 EP 2526209**

54 Título: **Medios y métodos para distinguir el FECV y el FIPV**

30 Prioridad:

**21.01.2010 EP 10151340**  
**18.01.2010 EP 10151001**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.04.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSITEIT UTRECHT HOLDING B.V. (100.0%)**  
**Yalelaan 40**  
**3584 CM Utrecht, NL**

72 Inventor/es:

**ROTTIER, PETRUS JOSEPHUS MARIE;**  
**CHANG, HUI-WEN y**  
**EGBERINK, HERMAN F.**

74 Agente/Representante:

**LAZCANO GAINZA, Jesús**

**ES 2 534 362 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

Medios y métodos para distinguir el FECV y el FIPV

- 5 La invención se refiere al campo del diagnóstico veterinario, más específicamente la invención se refiere al campo de los coronavirus felinos y a la identificación de los mismos.
- 10 Los coronavirus felinos (FCoVs) son patógenos comunes de Félidos domésticos y no domésticos, que incluyen pero sin limitarse a gatos, leones, tigres, leopardos, jaguares, linceos, caracales, guepardos, pumas y servales. En entornos con varios gatos domésticos se alcanza hasta el 90% de seropositividad a FCoV. Los FCoV se relacionan estrechamente con el coronavirus canino (CCoV) y el virus de la gastroenteritis transmisible (TGEV) de los cerdos. Existen dos serotipos, I y II, de FCoV de los cuales predomina el serotipo I, con un 80-95% de las infecciones FCoV. El tipo II FCoV presumiblemente resulta de la recombinación de ARN en animales que se infectan doblemente por el FCoV serotipo I y el CCoV, durante la cual un gen de la espícula del CCoV o parte del mismo se incorpora en el genoma del FCoV, al parecer un evento que
- 15 ocurre con poca frecuencia. El coronavirus entérico felino (FECV) es el patotipo más común de FCoV, tanto para el serotipo I como para el serotipo II. El FECV se limita principalmente a los intestinos, se propaga a través de la vía oral-fecal, y es altamente contagioso. La infección por FECV generalmente ocurre de manera no aparente; a veces, sin embargo, provoca síntomas tales como enteritis leve (Haijema y otros, 2007).
- 20 En la década de 1970 la peritonitis infecciosa felina (FIP), una enfermedad (entonces) poco frecuente pero grave en los gatos, se informó que la causa un coronavirus felino, que se llamó virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV). Contrariamente al FECV, el FIPV es altamente virulento. La infección por FIPV puede ser granulomatosa (en seco) o efusiva (húmeda) y es una enfermedad progresiva y generalmente fatal. Los síntomas de la FIP incluyen retraso del crecimiento en gatos jóvenes, cojera, fluctuación de la fiebre, inapetencia y pérdida de peso lo que resulta en la muerte (Pedersen 2009).
- 25 Una desregulación dramática del sistema inmune adaptativo acompaña la progresión de la FIP como se demuestra por la hipergammaglobulinemia y el agotamiento de células T linfoides y periféricas (Haijema y otros, 2007). Mientras que el FECV se limita al intestino, el FIPV es capaz de infectar - y replicarse en - monocitos y macrófagos lo que causa una enfermedad sistémica con afectación de múltiples órganos.
- 30 Existen dos teorías predominantes sobre el origen del FIPV. De acuerdo con la "hipótesis de la mutación", el FIPV se origina a partir del FECV por mutación de novo en felinos infectados lo que resulta en un virus FIP altamente virulento. La mutación que dio lugar al FIPV no se identificó pero se ha propuesto que ocurre en los genes no estructurales 3c, 7a o 7b (véase la figura 1), que codifican proteínas con función desconocida (Vennema y otros, 1998, Polonia y otros, 1996, Kennedy y otros, 2001, Pedersen 2009). Por lo tanto se cree que una mutación en el gen 3c, 7a o 7b o una combinación de mutaciones en
- 35 estos genes altera las propiedades biológicas del virus lo que permite que el coronavirus entérico infecte monocitos y macrófagos con lo que extiende de esta manera la infección a los órganos y causa FIP (Pedersen 2009): la transición de FECV a FIPV. La hipótesis de la mutación no se demostró formalmente.
- 40 De acuerdo con otra teoría, dos cepas distintas de FECV circulan en poblaciones naturales, una cepa virulenta y una no virulenta, y sólo los felinos que se infectan por la cepa virulenta desarrollarán FIP (Brown y otros, 2009). Brown y otros (2009) aislaron secuencias virales de gatos que sufrían de FIP, y de gatos asintomáticos (sanos) pero infectados con FECV. Mediante el uso de análisis filogenéticos se encontraron con que secuencias virales distintas están presentes en gatos enfermos y gatos sanos. Dye y Siddell (2007) compararon las secuencias virales de coronavirus felinos aislados del yeyuno y del hígado de un gato que sufría de FIP. De acuerdo con la teoría de la mutación, el FECV se limita a los intestinos,
- 45 mientras que el FIPV, que es capaz de infectar a macrófagos y monocitos, está presente en el hígado. Sin embargo, Dye y Siddell encontraron 100% de identidad de nucleótidos y así cuestionaron la hipótesis de la mutación según el cual el coronavirus del hígado es un coronavirus del yeyuno mutado. Ellos sugirieron que en los gatos que sufren de FIP la misma cepa de coronavirus felino virulenta estaba presente tanto en el hígado como en el yeyuno.
- 50 Anteriormente, los presentes inventores identificaron una serie de diferencias en la proteína de la espícula del FIPV 79-1146 y del coronavirus felino FECV 79-1683 adaptados a cultivo de tejidos (Rottier y otros, 2005). El FIPV 79-1146 contenía varias mutaciones en el dominio C-terminal de la proteína de la espícula, el dominio S2. Sin embargo, el FECV 79-1683 y el FIPV 79-1146 no son coronavirus felinos prototípicos y no son por lo tanto representativos para el FIPV y el FECV serotipo I con que se infectan la mayoría de los gatos (Pedersen 2009). En primer lugar, los coronavirus felinos serotipo II se originan
- 55 a partir de la recombinación de ARN de coronavirus caninos y felinos y contienen la proteína de la espícula del coronavirus canino. Las proteínas de la espícula de los coronavirus felinos y caninos tienen sólo aproximadamente un 45% de identidad de secuencia de aminoácidos (Motokawa y otros, 1996). En segundo lugar, el FECV 79-1683 y el FIPV 79-1146 son adaptados a cultivo de tejidos de líneas celulares que no sean macrófagos. Debido a que el FIPV infecta monocitos y

macrófagos *in vivo*, el tropismo de estas cepas de laboratorio difiere de los coronavirus felinos prototípicos. En tercer lugar, el FIPV 79-1146, a diferencia del FIPV serotipo I que infecta monocitos y macrófagos, es excepcionalmente virulento por cada vía común de infección (Pedersen 2009). En cuarto lugar, el FECV 79-1683 no puede calificarse como un verdadero FECV como se argumentó extensamente por Pedersen en su reciente revisión (Pedersen, 2009). En particular, el FECV 79-1.683 carece de la mayoría del gen 7b, que está presente en las cepas de FECV no adaptadas a cultivo de tejidos y tiene una mutación deletérea en su gen 3c, lo que indica que puede tener su origen a partir de un FIPV.

La infección por coronavirus felinos se demuestra generalmente por la presencia de anticuerpos en la sangre. No existe un tratamiento o vacuna eficaz para la infección por FIPV. Los gatos que desarrollan FIP mueren en cuestión de días o semanas - en el caso de FIP efusiva - o meses, en el caso de la FIP seca o granulomatosa. La solicitud de patente japonesa JP 7 327683 describe una proteína de la espícula del FIPV tipo 1, que contiene una leucina en la posición 1049, y su uso para la preparación de una vacuna. Una vacuna disponible comercialmente que consiste en un mutante de una cepa de FIPV sensible a la temperatura no demostró convincentemente su eficacia protectora en una serie de estudios de inmunización (McArdle y otros, 1995; Fehr y otros, 1997). Además, hasta la fecha no existe ninguna prueba de diagnóstico para discriminar entre FECV y FIPV, aunque WO 94/13836 y WO 95/08575 describen anticuerpos monoclonales que son reactivos con FIP pero no con FECV.

WO 02/066686 describe un método para distinguir el FIPV del FECV, en donde el ácido nucleico de la región M de un genoma de coronavirus se detecta en las células no entéricas de un gato.

Un factor adicional que complica la situación es que el cuadro clínico de la FIP es muy variable y, como consecuencia, la enfermedad no es fácil de establecer de manera inequívoca. El diagnóstico es frecuentemente una presunción, en base a parámetros anamnésicos, clínicos y no específicos de laboratorio. Debido a que no hay ninguna prueba de diagnóstico específica para el FIPV, frecuentemente tampoco es posible discriminar entre la FIP y otras enfermedades con síntomas solapados. Tanto las pruebas de diagnóstico para y vacunas contra el FIPV son muy necesarias debido a la evolución progresiva y debilitante de la FIP.

Es un objetivo de la presente invención proporcionar medios y métodos para distinguir el FIPV y el FECV.

Los presentes inventores encontraron que el FIPV alberga una alteración específica con relación al FECV en la proteína de la espícula en la posición de aminoácido 1049 como se representa en la figura 2B.

La invención por lo tanto proporciona un método para identificar el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) que comprende determinar la identidad de un aminoácido de una proteína de la espícula del coronavirus felino en una posición correspondiente a la posición de aminoácido 1049 como se representa en la figura 2B, e identificar el coronavirus felino como FIPV si la identidad del aminoácido que se determina es una leucina. De acuerdo con este método de la invención, el FECV se identifica si la identidad del aminoácido que se determina es metionina.

Con la identificación del FIPV o del FECV se entiende la identificación de un coronavirus felino tipo virulento (FIPV) o un avirulento (FECV). La identificación se llevó a cabo mediante la determinación de identidad de un aminoácido y/o secuencia de ácido nucleico de dicho coronavirus felino.

Una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino comprende una cadena de nucleótidos, preferentemente ADN(c) o ARN, que es parte de un coronavirus felino o que se obtiene de un coronavirus felino, ya sea directamente, o después de procesamientos, tales como por ejemplo mediante el uso de PCR transcriptasa inversa, y/o amplificación.

Una proteína de la espícula del coronavirus felino es una proteína de membrana del coronavirus felino que comprende un ectodominio. La proteína de la espícula es una de las cuatro proteínas estructurales canónicas del coronavirus y es responsable de la unión a y la entrada del virus en las células durante la infección.

El FIPV de las lesiones de los gatos con FIP patológicamente confirmada se comparó genéticamente con el FECV que se obtuvo de gatos asintomáticos. Las lesiones típicas de la FIP fueron lesiones (pió)granulomatosas que se presentaron en diferentes órganos internos principalmente en bazo, hígado, pulmón, riñón, o ganglios linfáticos mesentéricos. Debido a las altas tasas de mutación de los virus de ARN, se observaron numerosas diferencias entre secuencias del FECV y del FIPV individuales. Sin embargo, en los 47 aislamientos de FECV en heces o plasma, el aminoácido en la posición 1049 de la proteína de la espícula como se representa en la figura 2B es una metionina, mientras que en 52 de los 54 aislamientos de FIPV en lesiones se encontró una alteración del aminoácido en la posición 1049 como se representa en la figura 2B que resulta en una leucina en esta posición. Más tarde se descubrió que cinco secuencias que se clasificaron como derivadas de

gatos sanos derivaban en realidad de muestras de sangre de gatos con FIP confirmada (Q093501030\_326B\_4546.scf, Q093501032\_327B\_4546.scf, Q093501036\_321S\_4546.scf, Q093501038\_321A\_4546.scf y Q093501046\_K11\_019.ab1), lo que significa que la identidad del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 1049 como se representa en la figura 2B se determinó y demostró ser metionina en 42, en lugar de 47, muestras de aislamientos en heces o plasma de FECV de gatos sanos.

La secuencia de ácido nucleico que codifica la metionina en la posición 1049 de la proteína de la espícula del FECV corresponde al codón que comprende las posiciones de nucleótidos 3145, 3146 y/o 3147 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A. La secuencia de nucleótidos que codifica la metionina en la proteína de la espícula del FECV en la posición 1049 como se representa en la figura 2A es adenina-timina-guanina (a-t-g), que corresponde con la secuencia de adenina-uridina-guanina (a-u-g) en el ARN genómico viral. Cualquier sustitución de al menos un nucleótido en este codón de nucleótidos resulta en un aminoácido distinto de metionina en la proteína de la espícula del FECV en la posición 1049 como se representa en la figura 2B. De acuerdo con la presente invención la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos que se identifica en las posiciones de nucleótidos 3145, 3146 y/o 3147 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino, y la posición del aminoácido 1049 respectivamente como se muestra en las figuras 2A y 2B se utiliza para discriminar entre FIPV y FECV. Con la presente invención por primera vez se identificó en FIPV y FECV prototípico serotipo I un polimorfismo del coronavirus felino que permite distinguir entre FECV y FIPV.

Los presentes inventores encontraron además que una parte significativa del pequeño porcentaje de FIPV que no alberga la alteración específica con relación al FECV en la proteína de la espícula en el aminoácido 1049 como se muestra en la figura 2B, alberga una alteración específica con relación al FECV en la proteína de la espícula en la posición de aminoácido 1051 como se representa en la figura 2B. En estos casos, una serina en esta posición parecía sustituirse. Así, la alteración específica en la posición de aminoácido 1051 proporciona además un enfoque para identificar el FIPV.

La invención por lo tanto también proporciona un método para la identificación del virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) que comprende determinar la identidad de un aminoácido de una proteína de la espícula del coronavirus felino en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 1051 como se representa en la figura 2B, e identificar el coronavirus felino como FIPV si la identidad del aminoácido que se determina es alanina. Además se proporciona un método para determinar si el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) está presente en una muestra, que comprende determinar si dicha muestra comprende un coronavirus felino, y si un coronavirus felino está presente determinar la identidad de un aminoácido en una proteína de la espícula de dicho coronavirus felino en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 1051 como se representa en la figura 2B, y determinar que el FIPV está presente si dicho aminoácido es alanina.

En un conjunto de 97 gatos con FIP patológicamente confirmada, en 87 de 97 aislamientos de FIPV de lesiones una alteración del aminoácido en la posición 1049 como se representa en la figura 2B está presente lo que resultó en una leucina en esta posición. En cinco de los diez aislamientos de FIPV de lesiones en las que una metionina estaba presente en la posición 1049 como se representa en la figura 2B, una alteración del aminoácido en la posición 1051 como se representa en la figura 2B estaba presente lo que resultó en una alanina en esta posición. La secuencia de ácido nucleico que codifica la serina en la posición 1051 de la proteína de la espícula del FECV corresponde al codón que comprende las posiciones de nucleótidos 3151, 3152 y 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A. La serina se codifica por los codones de nucleótidos t/u-c-t/u, t/u-c-c, t/u-c-a, t/u-c-g, c-g-t/u y c-g-c. Cualquier sustitución de uno o más nucleótidos en este codón de nucleótidos que resulte en una secuencia de nucleótidos distinta de estos codones da como resultado un aminoácido distinto de serina en la proteína de la espícula del FECV en la posición 1051 como se representa en la figura 2B. De acuerdo con la presente invención, la secuencia de nucleótidos y/o aminoácidos que se identifica en cualquiera de las posiciones de nucleótidos 3151, 3152 y/o 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino, y/o en la posición del aminoácido 1051 de la proteína de la Espícula respectivamente, tal como se representa en las figuras 2A y 2B también se utiliza para discriminar entre FIPV y FECV. En una modalidad que se prefiere, una alteración de una serina en una posición de aminoácido correspondiente a la posición 1051 como se representa en la figura 2B es el resultado de una sustitución de la timina nucleobase en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3151 como se representa en la figura 2A con la guanina nucleobase.

En una modalidad, la identidad de aminoácidos en una proteína de la espícula de un coronavirus felino en posiciones correspondientes a las posiciones de aminoácidos 1049 y 1051 como se representa en la figura 2B se determinan ambas. Si se determina la identidad de estos dos aminoácidos, se obtiene una alta precisión en la distinción de FIPV y FECV. En una modalidad, se determina en una prueba la identidad de los aminoácidos en las posiciones 1049 y 1051 como se representa en la figura 2B. Sin embargo, también es posible determinar la identidad de estos aminoácidos secuencialmente. Por

ejemplo, se determina primero la identidad del aminoácido en una posición que corresponde a la posición 1049 como se representa en la figura 2B. Si se detecta la presencia de una metionina en esta posición, subsecuentemente la identidad del aminoácido en una posición que corresponde a la posición 1051 como se representa en la figura 2B se determina preferentemente. Si se detecta la presencia de una leucina en esta posición, la determinación de la identidad del aminoácido en una posición correspondiente a la posición 1051 como se representa en la figura 2B puede omitirse. Sin embargo, la identidad del aminoácido en esta posición podrá también determinarse en ese caso.

Una secuencia de ácido nucleico del gen de la espícula (nucleótidos 1-4407) del coronavirus felino que comprende los nucleótidos 20395-24801 como se define en la secuencia del número de acceso del gen NC\_012955 (Coronavirus felino UU10, genoma completo) y los nucleótidos 20382-24788 como se define en la secuencia del número de acceso del gen NC\_012952 (Coronavirus felino UU8, genoma completo) se presenta en la figura 2A. Los nucleótidos 20395-24801 de NC\_012955 codifican la proteína de la espícula del coronavirus felino (YP\_003038574). Los nucleótidos 20382-24788 de NC\_012952 codifican la proteína de la espícula del coronavirus felino (YP\_003038543). Por lo tanto, los nucleótidos 3145, 3146 y 3147 del gen que codifica la proteína de la espícula como se utiliza en toda de la descripción y como se representa en la figura 2A corresponden a los nucleótidos 23539, 23540 y 23541 del genoma completo como se define en la secuencia de NC\_012955 y/o los nucleótidos 23526, 23527 y 23528 del genoma completo como se define en la secuencia de NC\_012952. Los nucleótidos 3151, 3152 y 3153 del gen que codifica la proteína de la espícula como se utiliza en toda la descripción y como se representa en la figura 2A corresponden a los nucleótidos 23545, 23546 y 23547 del genoma completo como se define en la secuencia de NC\_012955 y/o los nucleótidos 23532, 23533 y 23534 del genoma completo como se define en la secuencia de NC\_012952.

La secuencia de aminoácidos de una proteína de la espícula del felino coronavirus que se refiere a la numeración de aminoácidos que se define en las secuencias de YP\_003038574 y YP\_003038543 que son traducciones parciales de NC\_012955 y NC\_012952 respectivamente se presentan en la figura 2B. La numeración de las posiciones de aminoácidos tal como se utiliza en toda la descripción se refiere a las posiciones de aminoácidos como se definen en YP\_003038574 y/o YP\_003038543. Una persona experta es capaz de identificar las posiciones de nucleótidos y aminoácidos en cualquier secuencia de coronavirus felino dada que corresponden a las posiciones de nucleótidos 3145, 3146 y/o 3147 y la posición del aminoácido 1049 y las posiciones de nucleótidos 3151, 3152 y/o 3153 y la posición del aminoácido 1051 como se representa en la figura 2A o 2B, por ejemplo mediante la utilización de un programa de alineación como "Align 2" o "Bioconductor".

Los síntomas de la FIP incluyen por ejemplo la acumulación de líquido ascítico en el abdomen (sólo en la FIP efusiva), retraso en el crecimiento, falta de apetito, fiebre, pérdida de peso y diarrea. Como se indicó anteriormente en la presente invención, síntomas similares se observaron también con los gatos que sufrían de otras enfermedades, por lo que un diagnóstico inequívoco de la FIP es hasta ahora imposible. Ahora que un polimorfismo se identificó para la proteína de la espícula del coronavirus felino que permite determinar la presencia de FIPV en una muestra se puede determinar si un felino, por ejemplo un gato, sufre de FIP. Debido a que en la actualidad no existe ningún tratamiento para la FIP, y el curso de la enfermedad es progresivo y debilitante lo que resulta inevitablemente en la muerte, se puede decidir la eutanasia a dicho gato cuando se demuestra que el animal porta el FIPV. Adicionalmente; el dueño del gato o del criadero puede tomar las medidas adecuadas para evitar la posible propagación de la infección y/o reducir las condiciones predisponentes tales como el estrés. Sin embargo, cuando el FIPV se demuestra que está ausente en un gato, la peritonitis infecciosa felina puede eliminarse como una posible causa de la enfermedad. Por lo tanto, en ese caso el gato no debe sacrificarse pero las técnicas de diagnóstico podrían continuarse y el animal podría ser provisto de tratamiento para la(s) enfermedad(es) alternativa(s) posible(s) los síntomas de la cual se parecen a los de la FIP. Tal tratamiento puede por ejemplo ser un tratamiento adicional para los síntomas o la aplicación de antibióticos para contrarrestar una posible causa bacteriana de la enfermedad.

Se proporciona además por la invención por lo tanto un método para determinar si el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) está presente en una muestra, que comprende preferentemente una muestra de un felino o de una sustancia que estuvo en contacto con un felino, determinar si dicha muestra comprende un coronavirus felino y, si un coronavirus felino está presente, determinar la identidad de un aminoácido en una proteína de la espícula de dicho coronavirus felino en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 1049 y/o 1051 como se representa en la figura 2B, y determinar que el FIPV está presente si dicho aminoácido en la posición de aminoácido 1049 es la leucina y/o si dicho aminoácido en la posición de aminoácido 1051 es alanina.

Una muestra que comprende un coronavirus entérico felino, virus de la peritonitis infecciosa felina, proteína (espícula) del coronavirus felino o ácido nucleico del coronavirus felino puede obtenerse de cualquier felino directa o indirectamente. Tal muestra puede por ejemplo obtenerse a partir de cualquier tejido felino o fluido o producto de la excreción. Los tejidos

felinos, líquidos o productos de excreción de los cuales se obtiene dicha muestra incluyen pero no se limitan a las lesiones de la FIP, sangre, células blancas de la sangre, plasma sanguíneo, suero de la sangre, saliva, ascitis, orina, heces, piel, músculo, ganglios linfáticos e hígado. Una muestra de acuerdo con la invención que se obtiene indirectamente de un felino puede comprender cualquier material que contenga tejidos felinos, fluido o productos de excreción, tal como por ejemplo suelo o arena para gatos. En una modalidad de la invención que se prefiere se obtiene una muestra de una lesión de la FIP, heces, sangre y/o ascitis. En una modalidad que se prefiere más se obtiene una muestra de células blancas de la sangre. Las muestras de sangre son relativamente fáciles de obtener de un animal, y las células blancas de la sangre se aíslan fácilmente a partir de una muestra de sangre subsecuentemente. Los presentes inventores encontraron que en 29 de 31 muestras de células blancas de la sangre que se obtuvieron a partir de gatos en las que una alteración de aminoácido en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 1049 como se representa en la figura 2B se detectó en una muestra de lesión de la FIP, la alteración de dicho ácido amino también estaba presente en la muestra de células blancas de la sangre. Así, la detección de una alteración de un aminoácido se detecta con precisión en muestras de glóbulos blancos de la sangre felinos.

5

10

15 Cuando se sospecha que un felino padece de una infección por coronavirus felino, un ácido nucleico del coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula, de manera que el ácido nucleico comprende las posiciones de nucleótidos 3145, 3146 y/o 3147 y/o las posiciones de nucleótidos 3151, 3152 y/o 3153 como se representa en la figura 2A se puede detectar en una muestra de dicho felino. Una muestra de dicho felino puede comprender ácido nucleico de coronavirus felino, o ácido nucleico aislado del coronavirus felino. Opcionalmente un ácido nucleico de coronavirus felino que comprende las posiciones de nucleótidos 3145, 3146 y/o 3147 y/o las posiciones de nucleótidos 3151, 3152 y/o 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A se amplifica antes de la detección. Una muestra de acuerdo con la invención puede comprender, además coronavirus felino o proteínas de coronavirus felino, lo que incluye pero sin limitarse a la proteína de la espícula.

20

25 De acuerdo con la presente invención la presencia de metionina en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 1049 de un coronavirus felino como se representa en la figura 2B es indicativa del FECV y la presencia de leucina en dicha posición es indicativa del FIPV. La presencia de alanina en una posición correspondiente a la posición del aminoácido 1051 de un coronavirus felino como se representa en la figura 2B es indicativa del FIPV.

30 La presencia de la nucleobase adenina (a) en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3145 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A, la nucleobase timina (t) en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3146 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A y la nucleobase guanina (g) en la posición correspondiente a la posición del nucleótido 3147 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A es indicativa de FECV y la presencia de cualquier nucleobase distinta de adenina (a) en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3145 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A, y/o cualquier otra nucleobase distinta de timina (t) en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3146 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A y/o cualquier otra nucleobase distinta de guanina (g) en la posición correspondiente a la posición del nucleótido 3147 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A es indicativa de FIPV. Así, la presencia de la nucleobase timina (t), y/o citosina (c), y/o guanina (g) en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3145 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A, y/o de la nucleobase adenina (a), y/o citosina (c), y/o guanina (g) en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3146 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A, y/o de la nucleobase adenina (a), y/o timina (t), y/o citosina (c) en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3147 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A es indicativa de FIPV. El coronavirus felino es un virus de ARN. Por lo tanto, cuando un nucleótido se identifica en la presente invención como timina, un uracilo se abarca también por dicho término, como se conoce por una persona experta.

35

40

45

50 Por lo tanto, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, en donde la identidad del aminoácido en la posición 1049 se determina mediante la determinación de una secuencia de ácido nucleico de un ácido nucleico de coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula, comprendiendo dicho ácido nucleico un nucleótido en, o correspondiente a, la posición 3145, 3146 y/o 3147 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A. En una modalidad que se prefiere, una citosina o timina o guanina en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3145 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A es indicativa del FIPV, y una adenina en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3145 de la gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A es indicativa del FECV. La invención proporciona además un método de acuerdo con la invención, en donde la identidad del

55

aminoácido en la posición 1051 se determina mediante la determinación de una secuencia de ácido nucleico de un ácido nucleico del coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula, comprendiendo dicho ácido nucleico un nucleótido en, o correspondiente a, la posición 3151, 3152 y/o 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A.

5

Los coronavirus son virus de ARN. El ARN viral puede aislarse y procesarse con los métodos que se conocen en la técnica. Por ejemplo, las muestras de ARN se pueden recién preparar a partir de células o tejidos en el momento de la cosecha, o se pueden preparar a partir de muestras que se almacenan a -70 °C hasta su procesamiento para la preparación de la muestra. Alternativamente, muestras de células o tejidos pueden almacenarse bajo condiciones que preserven la calidad del ARN. Ejemplos de estas condiciones conservantes son la fijación mediante la utilización por ejemplo de formalina, inhibidores de RNasa tales como RNasin (Pharmingen) o RNasecure (Ambion), disoluciones acuosas tales como RNeasy (Qiagen), Efecto de Protección con Solvente Orgánico (HOPE) mediado por tampón Ácido glutámico-Hepes, y RCL2 (Alphelys), y disoluciones no acuosas tales como Fijador Molecular Universal (Sakura Finetek EE.UU. Inc.). El ARN puede por ejemplo aislarse de acuerdo con el método de Chomczynski y Sacchi (1987) o el método de Boom y otros (1990), o sistemas comercialmente disponibles (tales como el estuche de aislamiento de ARN total RNeasy de QIAGEN, Alemania o el High-Pure-RNA-Isolation-Kit® de Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). Alternativamente, o adicionalmente, el ARN se transcribe inversamente en ADNc. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se realiza por ejemplo mediante la utilización de iniciadores específicos que se hibridan a una secuencia de ARN de interés y una enzima transcriptasa inversa. Además, la RT-PCR se puede realizar con iniciadores aleatorios, tales como por ejemplo hexámeros o decámeros aleatorios que se hibridan al azar a lo largo del ARN, u oligo d(T) que se hibrida con la cola poli(A) del ARNm, y la enzima transcriptasa inversa.

25

La amplificación de nucleótidos derivados de coronavirus felino, ya sea directamente o después de RT-PCR se puede realizar mediante la utilización de cualquier método de amplificación de ácido nucleico, tal como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR; Mullis y Faloona, 1987) o mediante el uso de reacciones de amplificación tales como Reacción en Cadena de la Ligasa (LCR; Barany, 1991), Replicación de Secuencia Auto-Sostenida (3SR; Guatelli y otros, 1990), Amplificación por Desplazamiento de Cadena (SDA; Walker y otros, 1992), Sistema de Amplificación Transcripcional (TAS; Kwok y otros, 1989), Q-Beta Replicasa (Lizardi y otros, 1988), Amplificación por Círculo Rodante (RCA; patente de los EE.UU. núm. 5,871,921), Amplificación Basada en en Ácido Nucleico (NASBA; Compton, 1991), Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Clivasa (patente de los EE.UU. núm. 5,719,028), Amplificación de Ácido Nucleico iniciada por Iniciadores Quimérica e Isotermal (ICAN), Método de Amplificación Ramificación-extensión (RAM; patente de los EE.UU. núm. 5,719,028 y 5,942,391) u otros métodos adecuados para la amplificación de ácidos nucleicos.

30

Tal como se utiliza en la presente invención, el término "ácido nucleico" o "molécula de ácido nucleico" comprende una cadena de nucleótidos, preferentemente de ADN y/o ARN.

35

El término "iniciador" tal como se utiliza en la presente invención se refiere a un oligonucleótido que es capaz de hibridar con el objetivo de amplificación lo que permite a una ADN polimerasa adherirse, sirviendo de esta manera como un punto de iniciación de la síntesis de ADN cuando se coloca en condiciones en las que se induce la síntesis del producto de extensión del iniciador, es decir, en presencia de nucleótidos y un agente para la polimerización tal como la ADN polimerasa y a una temperatura adecuada. Un iniciador de la amplificación es preferentemente de cadena simple para una máxima eficiencia en la amplificación. Preferentemente, un iniciador es un oligodesoxirribonucleótido. Un iniciador debe ser suficientemente largo para iniciar la síntesis de productos de extensión en presencia del agente para la polimerización. Las longitudes exactas de los iniciadores dependerán de muchos factores, lo que incluye la temperatura y la composición (contenido de A/T en G/C) del iniciador. Un par iniciador consiste en un iniciador directo y uno inverso tal como se utiliza comúnmente en la materia de la amplificación de ADN tal como en la amplificación por PCR.

40

45

El término "sonda" se refiere a una secuencia de oligonucleótido de cadena simple que reconocerá y formar un dúplex con enlaces de hidrógeno con una secuencia complementaria en un analito secuencia de ácido nucleico objetivo o su derivado de ADNc. Para facilitar la detección de la unión, una sonda específica de detección del amplicón puede comprender una porción de etiquetado tal como un fluoróforo, un cromóforo, una enzima o una radio-etiqueta, a fin de facilitar el seguimiento de la unión de las sondas al producto de reacción de la reacción de amplificación. Tales etiquetas se conocen bien por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), [beta]-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, estreptavidina, biotina, digoxigenina, <35>S, <14>C, <32>P y <125>I.

50

55

Un iniciador o sonda de acuerdo con la invención comprende una secuencia de ácido nucleico, preferentemente ADN y/o ARN. Dicha secuencia de ácido nucleico abarca además otros tipos de estructuras de ácido nucleico tales como por ejemplo una hélice de ADN/ARN, ácido nucleico peptídico (PNA), y/o ácido nucleico bloqueado (LNA). Por lo tanto, el término

"secuencia de ácido nucleico" abarca además una cadena que comprende los nucleótidos no naturales, nucleótidos modificados y/o bloques estructurales no nucleotídicos que exhiben la misma función que los nucleótidos naturales.

La hibridación se conoce en la materia y se refiere a la combinación de ácidos nucleicos complementarios, de cadena sencilla, preferentemente en condiciones rigurosas. El término "complementario", o "secuencia complementaria" se conoce además en la materia y se refiere a dos cadenas de ácidos nucleicos que pueden conectarse de forma no covalente por apareamiento de bases. Como se utiliza en la presente invención, "complementario" o "sustancialmente complementario" significa que dos secuencias de ácido nucleico tienen al menos aproximadamente 70%, preferentemente aproximadamente 80%, más preferentemente 90%, y más preferentemente aproximadamente 95%, de complementariedad de secuencias entre sí. Esto significa que los iniciadores y sondas deben exhibir suficiente complementariedad con su molde y con su ácido nucleico objetivo, respectivamente, para hibridarse en condiciones rigurosas. Por lo tanto, las secuencias del iniciador y de la sonda no necesitan reflejar la secuencia complementaria exacta de la región de unión en el molde y se pueden utilizar iniciadores degenerados. Por ejemplo, un fragmento nucleotídico no complementario puede unirse al extremo 5' del iniciador, con el resto de la secuencia del iniciador siendo complementario a la cadena.

El término "condiciones rigurosas" se refiere a las condiciones de hibridación que afectan la estabilidad de los híbridos, por ejemplo, temperatura, concentración de sal, pH, concentración de formamida y similares. Estas condiciones se optimizan empíricamente para maximizar la unión específica y minimizar la unión no específica del iniciador o sonda con su secuencia de ácido nucleico objetivo. El término tal como se utiliza incluye la referencia a las condiciones bajo las cuales una sonda o iniciador se hibridará con su secuencia objetivo, en un grado detectablemente mayor que con otras secuencias (por ejemplo al menos 2 veces respecto al fondo). Las condiciones rigurosas son dependientes de la secuencia y serán diferentes en diferentes circunstancias.

El término "% de identidad de secuencia" se define en la presente invención como el porcentaje de residuos en una secuencia de aminoácidos candidata o secuencia de ácido nucleico candidata que es idéntica a los residuos en una secuencia de referencia después de alinear las dos secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el máximo porcentaje de identidad. Los métodos y programas de ordenador para el alineamiento se conocen bien en la materia. Un programa de computadora que puede utilizarse o adaptarse a los efectos de determinar si una secuencia candidata cae dentro de esta definición es "Align 2", cuya autoría es de Genentech, Inc., que se presentó con la documentación del usuario en la Oficina de Derechos de Autor de Estados Unidos, Washington, DC 20559, el 10 de diciembre de 1991, o el Paquete UWGCG que proporciona el programa BESTFIT (Devereux y otros, 1984).

Un ácido nucleico del coronavirus felino que comprende un nucleótido correspondiente a la posición de nucleótido 3145, 3146 o 3147 y/o a las posiciones de nucleótidos 3151, 3152 o 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A puede amplificarse mediante la utilización de iniciadores que son capaces de hibridarse a por lo menos parte de dicha secuencia de ácido nucleico del coronavirus felino. Dichos iniciadores, por ejemplo hibridan con la secuencia de ácido nucleico del coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula entre una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3055 y una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3669 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A. Dichos iniciadores tienen preferentemente una longitud de entre 9 y 50 nucleótidos, por ejemplo 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 o 31 nucleótidos. El producto de ácido nucleico que se obtiene con un método de amplificación mediante la utilización de dichos iniciadores comprende preferentemente al menos 35 nucleótidos, más preferentemente al menos 40 nucleótidos, incluso más preferentemente al menos 50 nucleótidos.

Por lo tanto, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, que comprende además amplificar al menos una parte de una molécula de ácido nucleico del coronavirus felino que comprende una región que incluye, o que corresponde a, la posición de nucleótido 3145, 3146 y 3147 y/o a la posición de nucleótido 3151, 3152 y 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A mediante la utilización de al menos un iniciador que es capaz de hibridarse a por lo menos parte de dicha secuencia de ácido nucleico entre una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3055 y una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3669 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A.

Un par iniciador que se prefiere para utilizar en un método de acuerdo con la invención comprende un iniciador que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico 5'-CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA-3', con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con dicha secuencia de ácido nucleico, y un iniciador que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico 5'-CAATATTACAATGGCATAATGG-3', con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con dicha secuencia de ácido nucleico. Otro par iniciador que se prefiere para utilizar en un método de acuerdo con la invención comprende un iniciador que tiene al menos



90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico 5'-GGCATAATGGTTTTACCTGGTG-3', con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con dicha secuencia de ácido nucleico, y un iniciador que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico 5'-TAATTAAGCCTCGCCTGCACTT-3', con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con dicha secuencia de ácido nucleico.

En una modalidad un par iniciador de acuerdo con la invención comprende una combinación de una secuencia de ácido nucleico 5'-CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA-3' y una secuencia de ácido nucleico 5'-CAATATTACAATGGCATAATGG-3', o una combinación de una secuencia de ácido nucleico 5'-GGCATAATGGTTTTACCTGGTG-3' y una secuencia de ácido nucleico 5'-TAATTAAGCCTCGCCTGCACTT-3'.

En una modalidad de la invención, los pares iniciadores que se indicaron anteriormente se utilizan en una reacción de PCR anidada. En una reacción en cadena de la polimerasa anidada dos pares iniciadores se utilizan en reacciones de PCR sucesivas. El segundo par iniciador se utiliza para amplificar un producto de ácido nucleico o parte del mismo que se obtiene en la reacción de amplificación mediante la utilización del primer par iniciador. Por lo tanto, en una modalidad al menos parte de un ácido nucleico amplificado, que se amplificó mediante la utilización de un primer par iniciador, se amplifica adicionalmente mediante la utilización de un segundo par iniciador. Un primer par iniciador de acuerdo con la invención comprende, por ejemplo, un iniciador que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico 5'-CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA-3' y un iniciador que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico 5'-CAATATTACAATGGCATAATGG-3', y un segundo par iniciador de acuerdo con la invención comprende, por ejemplo, un iniciador que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico 5'-GGCATAATGGTTTTACCTGGTG3'- y un iniciador que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico 5'-TAATTAAGCCTCGCCTGCACTT3'-.

Se proporciona además por la invención el uso de un par iniciador de acuerdo con la invención, preferentemente para la identificación del coronavirus felino entérico (FECV) o el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), y/o para determinar la presencia de FIPV o la peritonitis infecciosa felina (FIP) en un animal sospechoso de padecer una infección por coronavirus felino.

La identidad de un nucleótido en la posición 3145, 3146 y/o 3147 y/o el nucleótido en la posición 3151, 3152 y/o 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino se puede determinar por cualquier método que se conozca en la materia. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a oligonucleótidos específicos de alelo (ASO), secuenciación de una secuencia de ácido nucleico (por ejemplo sistema de minisequenciación con serie de etiquetas [Fan y otros, 2000] o pirosecuenciación [Fakhrai-Rad y otros, 2002] ), PCR específica de alelo con un reactivo de bloqueo (ASB-PCR, Morlan y otros, 2009), ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA, Baron y otros, 1996), espectrometría de masas (MS, por ejemplo desorción/ionización láser asistida por matriz tiempo de vuelo (MALDI-TOF) MS, Crain y McCloskey 1998), reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR), hibridación electrónica, polimorfismo de conformación de cadena individual de ADN (F-SSCP) (Makino y otros, 1992), cromatografía líquida desnaturalizante de alto rendimiento (DHPLC), electroforesis en gel (por ejemplo, electroforesis diagonal en gel de arreglos de microplacas [MADGE, Day y otros, 1998] y la electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante [DGGE, Fischer y Lerman 1980]), y el análisis de microarreglos.

Los oligonucleótidos específicos de alelos (ASO) son sondas fluoróforo-, cromóforo-, enzima- o radio-etiquetadas que son cortas y específicas para secuencias de ARN o ADN particulares. Los ASO, por ejemplo, comprenden una mutación de nucleótidos y sólo se hibridan con secuencias de ácidos nucleicos que comprenden esta mutación. La secuencia de ácido nucleico de una secuencia de ácido nucleico del coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula que comprende un nucleótido en, o que corresponde a, la posición 3145, 3146 y/o 3147 y/o a la posición de nucleótido 3151, 3152 y/o 3153 como se representa en la figura 2A se detecta por ejemplo mediante la utilización de una sonda que es capaz de hibridarse específicamente a al menos parte de dicha secuencia de ácido nucleico del coronavirus felino que comprende un nucleótido correspondiente a la posición del nucleótido 3145, 3146, y/o 3147 y/o a la posición del nucleótido 3151, 3152 y/o 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A. Dicha sonda tiene preferentemente una longitud de entre 14 y 100 nucleótidos, preferentemente 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, o más nucleótidos. Por lo tanto, en una modalidad una secuencia de ácido nucleico del coronavirus felino que comprende un nucleótido en, o que corresponde a, la posición 3145, 3146 y 3147 y/o a la posición de nucleótido 3151, 3152 y 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A se detecta mediante la utilización de una sonda con una longitud de al menos 14 nucleótidos que es capaz de hibridarse específicamente a al menos parte de dicho ácido nucleico. En una modalidad que se prefiere una sonda es capaz de hibridarse específicamente a un ácido nucleico del coronavirus felino que comprende citosina o timina en una posición correspondiente a la posición del nucleótido 3145 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se representa en la figura 2A.

Una sonda usada en un método de acuerdo con la invención es complementaria a una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula que comprende un nucleótido que corresponde a la posición de nucleótidos 3145, 3146, y 3147 y/o la posición de nucleótidos 3151, 3152 y 3153 como se describe en la figura 2A. Debido a que los coronavirus son ARN virus tienen índices de mutación relativamente altos como lo conocerá una persona experimentada. Por ello, la secuencia de los coronavirus felinos puede diferir en algunos nucleótidos cercanos a la posición de nucleótidos 3145, 3146, y 3147 y/o la posición de nucleótidos 3151, 3152 y 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino. Una persona con experiencia en la materia conoce cómo se modifica una sonda de acuerdo con la invención, por ejemplo mediante la sustitución de un ácido nucleico, para permitir a dicha sonda hibridarse a la secuencia de ácido nucleico de un coronavirus felino específico y detectar un nucleótido en, o que corresponde a, la posición 3145, 3146, o 3147 y/o la posición 3151, 3152 o 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se describe en la figura 2A.

Una sonda preferida que comprende un nucleótido que corresponde a las posiciones de nucleótidos 3145, 3146, y 3147 como se describe en la figura 2A para el uso en un método de acuerdo con la invención comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia de ácido nucleico 5'-CCCARRGCCATAGG-3', en donde R es A o G, con la máxima preferencia al menos 95% de identidad de secuencia con dicha secuencia de ácido nucleico. En una modalidad la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, en donde dicha sonda comprende la secuencia CCCARRGCCATAGG. La invención proporciona además un uso de una sonda de acuerdo con la invención, preferentemente para identificar el coronavirus entérico felino (FECV) y/o el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), y/o para determinar la presencia de la peritonitis infecciosa felina (FIP) en un animal con sospecha de padecer una infección por coronavirus felino.

Las secuencias nucleicas de coronavirus felino pueden determinarse mediante métodos de secuenciación conocidos por la persona experimentada, preferentemente de forma directa luego de la amplificación del ácido nucleico relevante. Estos métodos comprenden por ejemplo la secuenciación directa de nucleótidos de la cadena doble mediante el uso de terminadores dideoxynucleótidos marcados fluorescentemente (Smith y otros, 1986), la minisequenciación con serie de etiquetas o la pirosecuenciación. Generalmente tales métodos de secuenciación incluyen el aislamiento de los ácidos nucleicos del genoma viral mediante los procedimientos de aislamiento de ácidos nucleicos, y la determinación de la secuencia de nucleótido del ácido nucleico aislado, por ejemplo mediante los métodos de terminación de la cadena dideoxi (Sanger y otros, 1977) precedido opcionalmente por la transcripción inversa de ARN en ADN, y/o la amplificación del ácido nucleico objetivo.

En una modalidad se secuencia al menos parte de una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino que comprende un nucleótido que corresponde a la posición de nucleótidos 3145, 3146 y/o 3147 y/o la posición de nucleótidos 3151, 3152 y 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se describe en la figura 2A.

El ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA) es un método para la detección de polimorfismos conocidos de nucleótidos únicos. El método se basa en la ligación de dos sondas de oligonucleótidos adyacentes mediante el uso de una ADN ligasa mientras que ellas se hibridan a un objetivo de ADN complementario. Una de las sondas por ejemplo se marca fluorescentemente y es específica de alelo. Típicamente, existen dos sondas marcadas de forma diferente, una para cada alelo. Estas dos sondas difieren solo en la secuencia en la última base en el extremo 3', por lo tanto en el sitio del polimorfismo. La segunda sonda es una sonda común que es complementaria a la secuencia de ADN objetivo inmediatamente corriente abajo (3') del sitio que contiene el polimorfismo, y por lo tanto complementaria a ambos alelos. Esta sonda no necesita marcarse fluorescentemente. La discriminación de alelos ocurre por la capacidad de la ADN ligasa de unir las sondas perfectamente apareadas, un desapareamiento en 3' en la sonda de captura impedirá la ligación. En un método de la invención, por ejemplo se usa un ensayo de ligación de oligonucleótidos en donde una de las sondas es específicamente capaz de hibridarse a una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula que comprende una adenina en la posición de nucleótido 3145 como se describe en la figura 2A lo que es indicativo de FECV. Por lo tanto el primer nucleótido de una sonda derecha o el último nucleótido de una sonda izquierda es una timina. La segunda sonda es una sonda común, que es capaz de hibridarse a ambas secuencias de ácidos nucleicos de FECV y FIPV que comienzan próximas a la posición 3145 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se describe en la figura 2A, por ejemplo que comienza en la posición 3146 si dicha segunda sonda es una sonda derecha. En presencia de FECV, es posible la ligación de dichas dos sondas, mientras que en presencia de FIPV, no es posible la ligación de dichas dos sondas. En una modalidad de la invención se determina una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula, que comprende la posición de nucleótidos 3145, 3146 y/o 3147 mediante el uso de un ensayo de ligación de oligonucleótidos (OLA).

La tecnología de PCR en tiempo real puede usarse para detectar un alelo específico de un gen cuando se usa un reactivo bloqueador. Esta tecnología se llama PCR específica de alelo con un reactivo bloqueador (ASB-PCR, Morlan y otros, 2009). Durante la reacción por PCR un agente bloqueador se añade a la mezcla de reacción para impedir la amplificación de un alelo. Uno de los iniciadores, por ejemplo el iniciador directo, se diseña como iniciador específico de alelo mutante. El otro iniciador es un iniciador común, que es capaz de hibridarse a ambos alelos. Un agente bloqueador, que se fosforila en el extremo 3' para impedir la amplificación, se diseña después para unirse específicamente al alelo silvestre. Durante la reacción por PCR el agente bloqueador impide la hibridación del iniciador específico de mutante al alelo silvestre. En presencia de solo el alelo silvestre no se obtiene producto de amplificación, mientras que en presencia de solo el alelo mutante se obtiene un producto de amplificación. Con ASB-PCR es posible por ejemplo discriminar entre una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino que comprende una adenina en la posición de nucleótido 3145 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se describe en la figura 2A y que es indicativa de FECV, y una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino que comprende una citosina o una timina en dicha posición, que es indicativa de FIPV. Por ejemplo, se usa un conjunto de iniciadores que consiste en un iniciador inverso común y dos iniciadores específicos de ácido nucleico de FIPV de los que el nucleótido del extremo 3' es complementario a la posición de nucleótido 3145 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se describe en la figura 2A. Uno de estos iniciadores específicos de FIPV tiene una adenina en su extremo 3' y el otro iniciador tiene una guanina en su extremo 3' lo que permite a dicho iniciador hibridarse a una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula que contiene una timina o una citosina en la posición de nucleótido 3145 respectivamente. Puede usarse un agente bloqueador que comprende una timina en el extremo 3', que es capaz de hibridarse a una adenina en la posición de nucleótido 3145. Mediante el uso de dicho conjunto de iniciadores, la amplificación ocurrirá cuando el ácido nucleico de FIPV esté presente mientras que la amplificación no ocurrirá cuando solo esté presente el ácido nucleico de FECV. En una modalidad preferida de la invención se determina una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula, que comprende la posición de nucleótidos 3145, 3146 y/o 3147 y/o la posición de nucleótidos 3151, 3152 y/o 3153 mediante el uso de PCR específica de alelos con un reactivo bloqueador (ASB-PCR).

Mediante el uso de MS MALDI TOF puede lograrse la detección de cantidades bajas (femtomo) de ADN. Los ácidos nucleicos en el intervalo de 2 a 2000 nucleótidos pueden detectarse al usar MS MALDI-TOF. La MS puede usarse para analizar mezclas de fragmentos diferentes de ácidos nucleicos sin el uso de cualquier marcador debido a las diferencias de masas de las nucleobases. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, la separación de los fragmentos de ácido nucleico no es necesaria antes de las mediciones por MS. Mediante el uso de MS MALDI-TOF es posible por ejemplo determinar si un nucleótido de una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula en la posición de nucleótido 3145 es una adenina, que es indicativa de FECV, o una citosina o timina, que es indicativa de FIPV. En una modalidad de la invención se determina la masa de al menos parte de una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino, dicha parte que comprende un nucleótido que corresponde a la posición de nucleótidos 3145, 3146, y/o 3147 y/o la posición de nucleótidos 3151, 3152 y/o 3153 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se describe en la figura 2A. En una modalidad preferida la masa de dicha secuencia de ácido nucleico se determina mediante el uso de la espectrometría de masa de tiempo de vuelo por desorción/absorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS).

La identidad de un aminoácido en una secuencia de aminoácidos de coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula en la posición de aminoácido 1049 y/o la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B puede detectarse mediante el uso de cualquier método conocido en la materia. Tal aminoácido se detecta por ejemplo mediante el uso de anticuerpos o equivalentes funcionales de ellos, espectrometría de masa o reacciones de degradación de Edman. Opcionalmente, una proteína coronaviral puede purificarse con métodos conocidos en la materia. Por ejemplo, la proteína coronaviral puede purificarse mediante el uso de electroforesis en gel o métodos cromatográficos, tales como la cromatografía de afinidad.

Un equivalente funcional de un anticuerpo se define como un compuesto que tiene al menos una misma propiedad igual que dicho anticuerpo en tipo, no necesariamente en cantidad. Dicho equivalente funcional es capaz de unir el mismo antígeno igual que dicho anticuerpo, aunque no necesariamente a la misma medida. Un equivalente funcional de un anticuerpo comprende preferentemente un anticuerpo de dominio único, un anticuerpo de cadena única, un nanocuerpo, un unicuerpo o un fragmento variable de cadena única (scFv). Un equivalente funcional de un anticuerpo se produce por ejemplo al alterar un anticuerpo tal que al menos una propiedad - preferentemente una propiedad de unión al antígeno - del compuesto resultante sea esencialmente la misma en tipo, no necesariamente en cantidad. Esto se hace de varias maneras, por ejemplo a través de la sustitución de aminoácidos conservativos, de manera que un residuo de aminoácido se sustituye por otro residuo con propiedades generalmente similares (tamaño, hidrofobicidad, etc), tal que es probable que el funcionamiento global no se afecte seriamente.

- 5 Una parte inmunogénica de un coronavirus felino que comprende una proteína de la espícula del coronavirus felino se define como una parte que tiene al menos una propiedad en común con un coronavirus felino que comprende una proteína de la espícula del coronavirus felino en tipo, aunque no necesariamente en cantidad. Una parte inmunogénica de una proteína de la espícula del coronavirus felino se define como una parte que tiene al menos una misma propiedad igual que una proteína de la espícula del coronavirus felino en tipo, no necesariamente en cantidad. Dicha parte inmunogénica, es capaz preferentemente de provocar una respuesta inmune contra un coronavirus felino, preferentemente un virus de la peritonitis infecciosa de felino (FIPV), en un animal.
- 10 Un aminoácido de una secuencia de aminoácidos de la proteína de la espícula del coronavirus felino, que corresponde a la posición de aminoácido 1049 y/o la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B se detecta por ejemplo mediante el uso de un anticuerpo o equivalente funcional que se dirige específicamente contra un epítipo de una proteína de la espícula del coronavirus felino que comprende la posición de aminoácido 1049 y/o la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B. Dicha posición de aminoácido 1049 y/o posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B permite la discriminación entre FECV y FIPV. Una metionina en la posición de aminoácido 1049 es indicativa de FECV, mientras que la leucina en esta posición es indicativa de FIPV y la alanina en la posición de aminoácido 1051 es indicativa de FIPV. Por ello, la invención proporciona un método de acuerdo con la invención, en donde se detecta un aminoácido de una proteína de la espícula del coronavirus felino en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1049 y/o la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B al usar un anticuerpo o equivalente funcional de él dirigido específicamente contra un epítipo de una proteína de la espícula de FIPV que abarca el aminoácido 1049 y/o el aminoácido 1051. En una modalidad dicho epítipo comprende una leucina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1049 y/o dicho epítipo comprende una alanina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B.
- 20 Un anticuerpo o equivalente funcional de él dirigido específicamente contra un epítipo de una proteína de la espícula de FIPV, cuyo epítipo comprende un aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 1049 y/o la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B puede detectarse con cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, dicho anticuerpo o equivalente funcional de él se marca con fluoróforo, cromóforo o enzima, y puede detectarse por lo tanto por ejemplo con microscopía de fluorescencia o espectrofotometría. Un anticuerpo o equivalente funcional puede detectarse además mediante el uso de un segundo anticuerpo que se marca con fluoróforo, cromóforo o enzima. Tales marcadores son bien conocidos por los expertos en la materia e incluyen, por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína (FITC), [beta]-galactosidasa, peroxidasa de rábano picante, estreptavidina, biotina o digoxigenina.
- 25 Mediante el uso de MS MALDI-TOF puede lograrse la detección de cantidades bajas de secuencias de aminoácidos. La MS puede usarse para analizar mezclas de secuencias diferentes de aminoácidos sin el uso de cualquier marcador debido a las diferencias de masa de las secuencias de aminoácidos. Por lo tanto, en la mayoría de los casos, la separación de las secuencias de aminoácidos no es necesaria antes de las mediciones por MS. Mediante el uso de MS MALDI-TOF es posible por ejemplo discriminar entre una secuencia de aminoácidos de coronavirus felino que comprende una metionina en la posición de aminoácido 1049 como se describe en la figura 2B, y una secuencia de aminoácidos de coronavirus felino que comprende un aminoácido distinto a la metionina en la posición de aminoácido 1049 como se describe en la figura 2B. En una modalidad de la invención se determina la masa de al menos parte de una secuencia de aminoácidos de coronavirus felino, dicha parte que comprende un aminoácido que corresponde a la posición de aminoácido 1049 como se describe en la figura 2B. En una modalidad preferida se determina la masa de dicha secuencia de aminoácidos mediante el uso de espectrometría de masa de tiempo de vuelo por desorción/absorción mediante láser asistida por matriz (MS MALDI-TOF).
- 30 El desarrollo de vacunas contra FIPV ha sido infructuoso hasta la fecha. Varias propuestas fallaron en proporcionar una vacuna que induzca protección contra FIPV. Estas propuestas incluyen la vacunación con coronavirus vivos heterólogos relacionados estrechamente, cantidades no letales de FIPV virulento, FIPV de baja virulencia, y subunidades o proteínas de coronavirus felino (recombinante). Algunas de estas propuestas proporcionaron alguna protección pero los resultados fueron inconsistentes. Ocasionalmente, la vacunación resultó aun en la progresión aumentada de la enfermedad y la muerte. La única vacuna actualmente disponible se basa en una cepa de FIPV sensible a la temperatura de la que la eficacia es cuestionable (McArdle y otros, 1995; Fehr y otros, 1997).
- 35 Ahora que se ha identificado un polimorfismo en la proteína de la espícula del coronavirus felino que permite la discriminación entre FECV y FIPV es posible desarrollar composiciones inmunogénicas que comprendan los coronavirus felino que comprenden el ácido nucleico o aminoácido identificado indicativo para FECV. Mediante el uso de una composición inmunogénica que comprende un coronavirus felino con un ácido nucleico o aminoácido representativo de un FECV no existe riesgo de enfermedad y/o muerte debido a que dicha composición inmunogénica no comprende el FIPV

virulento o parte de él. Ahora es posible además desarrollar una composición inmunogénica que comprenda la proteína de la espícula del coronavirus felino que comprende el aminoácido identificado indicativo para FIPV. Mediante el uso de una composición inmunogénica que comprende la proteína de la espícula de FIPV o parte inmunogénica de ella puede provocarse una mejor respuesta inmune contra FIPV, sin el riesgo de progresión aumentada de la enfermedad y/o muerte debido a que solo se usan proteínas virales aisladas.

Por ello en una modalidad la invención proporciona una composición inmunogénica que comprende una proteína de la espícula del coronavirus felino o parte inmunogénica de ella que comprende una alanina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B, o un ácido nucleico del coronavirus felino codificador de la proteína de la espícula, que comprende una citosina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3145, y/o una guanina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3151 como se describe en la figura 2A, o un coronavirus felino que comprende un ácido nucleico que comprende una adenina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3145, y/o una timina en una posición que corresponde a la posición 3151 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se describe en la figura 2A, o un coronavirus felino que comprende una metionina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1049, y/o una serina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B, o cualquier combinación de ellos. En una modalidad preferida se usa como una vacuna una composición inmunogénica de acuerdo con la invención.

Se proporciona además una proteína de la espícula del coronavirus felino o parte inmunogénica de ella que comprende una alanina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B, o un ácido nucleico de coronavirus felino codificador de la proteína de la espícula que comprende una citosina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3145, y/o una guanina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3151 como se describe en la figura 2A, o un coronavirus felino que comprende un ácido nucleico que comprende una adenina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3145, y/o una timina en una posición que corresponde a la posición 3151 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se describe en la figura 2A, o un coronavirus felino que comprende una proteína de la espícula del coronavirus felino o parte inmunogénica de ella que comprende una metionina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1049, y/o una serina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B, o cualquier combinación de ellos, para provocar una respuesta inmune contra un coronavirus felino, preferentemente un virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), en un felino.

Una modalidad proporciona un uso de una proteína de la espícula del coronavirus felino o parte inmunogénica de ella que comprende una alanina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B, o un ácido nucleico de coronavirus felino codificador de la proteína de la espícula que comprende una citosina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3145, y/o una guanina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3151 como se describe en la figura 2A, o un coronavirus felino que comprende un ácido nucleico que comprende una adenina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3145, y/o una timina en una posición que corresponde a la posición 3151 del gen que codifica una proteína de la espícula del coronavirus felino como se describe en la figura 2A, o un coronavirus felino que comprende una proteína de la espícula del coronavirus felino o parte inmunogénica de ella que comprende una metionina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1049, y/o una serina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B, o cualquier combinación de ellos, para la preparación de una composición inmunogénica o agente profiláctico para provocar una respuesta inmune contra un coronavirus felino, preferentemente un virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), en un felino.

La invención se explica además en los siguientes ejemplos. Estos ejemplos no limitan el alcance de la invención, sino que simplemente sirven para evidenciar la invención.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Representación esquemática del genoma del ARN de coronavirus felino. La parte 5' (izquierda) especifica los precursores que codifican las funciones de replicación y de transcripción derivadas de los marcos de lectura abiertos (ORF) 1a y 1b. Corriente abajo, hacia el extremo 3', se localizan los genes para las proteínas estructurales S (proteína de la espícula), E (proteína de la envoltura), M (proteína de la membrana) y N (proteína de la nucleocápsida), y para las proteínas accesorias 3a, 3b, 3c, 7a y 7b.

Figura 2. A) Secuencias de nucleótidos del gen de la espícula del coronavirus felino (nucleótidos 1-4407), que corresponden a los nucleótidos 20395-24801 de un coronavirus felino como se define en la secuencia de nucleótidos de NC\_012955 (Coronavirus felino UU10, genoma completo) y los nucleótidos 20382-24788 de un coronavirus felino como se define en la secuencia de nucleótidos de NC\_012952 (Coronavirus felino UU8, genoma completo). B) Secuencias de aminoácidos de la proteína de la espícula del coronavirus felino, como se define en la secuencia de aminoácidos de YP\_003038574 y de YP\_003038543.

Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa de ARN amplificado de 6 muestras clínicas obtenidas a partir de heces de gatos infectados. El carril M es un estándar de tamaño molecular, los carriles 1-6 son las muestras clínicas y el carril 7 es un control negativo.

Figura 4. A) Alineación de secuencias parciales de ARN de FCoV derivado de heces o plasma aislado de 42 gatos saludables y cinco secuencias parciales derivadas de muestras de gatos confirmados con FIP, es decir Q093501030\_326B\_4546.scf (derivadas de células blancas sanguíneas), Q093501032\_327B\_4546.scf (derivadas de células blancas sanguíneas), Q093501036\_321S\_4546.scf (derivadas de suero), Q093501038\_321A\_4546.scf (derivadas de ascitis) y Q093501046\_K11\_019.ab1 (derivadas de células blancas sanguíneas); B) Alineación de secuencias parciales de ARN de FCoV derivado de lesión aislado de 54 gatos confirmados con FIP; C) Alineación de secuencias parciales de ARN de FCoV derivado de heces aislado de gatos confirmados con FIP. Sobre la derecha de las figuras 4A, B y C se indica el código de identidad del coronavirus felino analizado. Los nucleótidos dirigidos y el aminoácido previsto se indican por una flecha.

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

En este ejemplo se analizaron 6 muestras clínicas (heces). El ARN se extrajo de las muestras clínicas, se aplicó RT-PCR a los ARN extraídos y los productos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa (ver figura 3) luego de la primera PCR (1<sup>ra</sup> corrida) y luego la PCR anidada (2<sup>da</sup> corrida).

##### Materiales y Métodos

Una RT-PCR anidada se usó para amplificar la región del gen de la espícula de FCoV que contiene la mutación puntual objetivo. El ARN genómico se extrajo de las heces de 6 gatos saludables mediante el uso del mini estuche QIAamp Viral RNA y el mini estuche Qiagen RNeasy (Qiagen, Inc.) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La síntesis del ADNc se realizó con la transcriptasa inversa (RT) M-MLV y se continuó con la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la Taq ADN polimerasa. Todas las enzimas se usaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Promega Corp., Madison, WI). Ambas reacciones se prepararon con iniciadores específicos (ver tabla 1 de iniciadores). Los iniciadores se diseñaron mediante el uso de secuencias del genoma de FCoV con números de adquisición de NC\_012955 y NC\_012952. Las amplificaciones se realizaron mediante el uso de 30 ciclos de 94 °C durante 60 s, 50 °C durante 30 s, y 72 °C durante 1 min y la extensión adicional a 72 °C durante 7 min al final de la amplificación. Los fragmentos de PCR se aislaron y se purificaron a partir de gel de agarosa luego de la electroforesis mediante el uso del estuche de extracción en gel Qiagen (Qiagen Benelux B.V., Venlo, Los Países Bajos). La secuenciación se realizó mediante BaseClear Holding B.V. (Leiden, Los Países Bajos).

##### Resultados

Luego de la primera PCR, se obtuvo un fragmento de 601 pb solo en una muestra clínica, como se ve en el carril 2 de la figura 3. Luego de la segunda ronda de PCR, se amplificó un fragmento de 139 pb cuando los iniciadores anidados se aplicaron sobre los productos de la 1<sup>ra</sup> corrida de la RT-PCR. Ahora un producto se vio no solo en el carril 2, sino además con los ARN amplificados mostrados en los carriles 3, 5 y 6.

##### Ejemplo 2

En este ejemplo se analizaron muestras de heces o plasma de 47 gatos saludables, muestras clínicas de 54 gatos confirmados con FIP y muestras de heces de 14 gatos confirmados con FIP.

##### Materiales y Métodos

La extracción del ARN genómico, la síntesis, la amplificación y la secuenciación del ADNc se realizaron de acuerdo con los materiales y métodos del ejemplo 1.

Resultados

La secuencia de ácido nucleico que codifica una metionina en la posición de aminoácido 1049 se detectó en todos los FCoV (47/47) derivados de heces o plasma de gatos saludables (figura 4A). Más tarde se encontró que la figura 4A contiene cinco secuencias derivadas de muestras de gatos con FIP confirmada (Q093501030\_326B\_4546.scf, Q093501032\_327B\_4546.scf, Q093501036\_32IS\_4546.scf, Q093501038\_321A\_4546.scf y Q093501046\_K11\_019.ab1), lo que significa que en 42/42 de los FCoV derivados de heces o plasma de gatos saludables estuvo presente una metionina en la posición de aminoácido 1049. Esta secuencia se observó además en 2/54 de los ARN amplificados derivados de lesión (figura 4B) y 12/14 de los derivados de heces (figura 4C) de gatos confirmados con FIP. Lo más importante, 52/54 (96%) de los ARN derivados de lesiones de gatos confirmados con FIP tuvieron una alteración de A a C o T en la posición 3145, lo que conduce a una alteración de aminoácido en la posición 1049 que cambia una metionina en una leucina (figura 4B).

Ejemplo 3

Se continuó recolectando muestras y gatos a través de veterinarios y propietarios en Los Países Bajos. En este ejemplo se analizaron las siguientes muestras:

- muestras de heces de 352 gatos saludables,
- muestras de células blancas sanguíneas de 89 gatos saludables o sin sospecha de FIP,
- muestras de plasma de 89 gatos saludables o sin sospecha de FIP,
- muestras de suero de 56 gatos saludables o sin sospecha de FIP,
- muestras de lesión de FIP (nódulo linfático mesentérico (LN) y/o riñón y/o bazo y/o omentum y/o pulmón y/o LN y/o hígado y/o ascitis) de 97 gatos confirmados con FIP,
- muestras de células blancas sanguíneas de 34 gatos confirmados con FIP,
- muestras de plasma de 34 gatos confirmados con FIP, y
- muestras de suero de 15 gatos confirmados con FIP.

Materiales y Métodos

La extracción del ARN genómico, la síntesis, amplificación y secuenciación del ADNc se realizaron de acuerdo con los materiales y métodos del ejemplo 1.

Resultados

*Muestras de gatos saludables*

137/352 (39%) de las muestras de heces fueron positivas a FCoV. Se detectó una secuencia de ácido nucleico que codifica una metionina en la posición de aminoácido 1049 y una serina en la posición de aminoácido 1051 en todos los FCoV (137) derivados de heces de gatos saludables.

*Muestras de gatos saludables o sin sospecha de FIP.*

Las muestras de sangre con EDTA de 89 gatos saludables o sin sospecha de FIP se obtuvieron y se separaron en células blancas sanguíneas (WBC) y plasma. Se obtuvieron muestras de suero de 56 gatos saludables o sin sospecha de FIP.

20/89 muestras de células blancas sanguíneas, 4/89 muestras de plasma y 8/56 muestras de suero fueron positivas a FCoV. Todas las 4 muestras positivas en plasma fueron positivas además en la fracción de WBC y en cada animal la secuencia en plasma fue 100% idéntica a la secuencia en WBC. Se detectó una secuencia de ácido nucleico que codifica una metionina en la posición de aminoácido 1049 y una serina en la posición de aminoácido 1051 en todas las muestras probadas positivas para FCoV.

*Muestras de gatos confirmados con FIP*

Se estudiaron un total de 97 gatos confirmados con FIP. 97/97 órganos con lesiones típicas de FIP (que incluyen LN mesentérica y/o riñón y/o bazo y/o omentum y/o pulmón y/o LN y/o hígado y/o ascitis) fueron positivos para FCoV. 87/97 (90%) de los ARN derivados de lesiones de gatos confirmados con FIP tuvieron una alteración de aminoácido en la posición 1049 que cambia una metionina en una leucina. 5/97 (5%) de los ARN derivados de lesiones de gatos confirmados con FIP tuvieron una alteración de aminoácido en la posición 1051 que cambia una serina en una alanina. En todas las 5 muestras en las que estuvo presente una alanina en la posición 1051, estuvo presente una metionina en la posición 1049. Por lo tanto, 92 de 97 (95%) de los ARN derivados de lesiones de gatos confirmados con FIP tuvieron una alteración de aminoácido indicativa para FIP, mientras que 5 de 97 (5%) no tuvieron una alteración de aminoácido indicativa para FIP.

La sangre se obtuvo de 34 de los 97 gatos confirmados con FIP antes de aplicarle eutanasia al animal. Las muestras de sangre se separaron en células blancas sanguíneas (recubrimiento beige) y plasma. Se obtuvieron las muestras de suero de 15 gatos confirmados con FIP de los que se habían obtenido además la sangre con EDTA.

WBC:

34/34 (100%) de las muestras de WBC fueron positivas a FCoV. En 29/34 (85%) de los ARN derivados de WBC de gatos confirmados con FIP estuvo presente una leucina en la posición 1049 y una serina estuvo presente en la posición 1051; para los 29 estuvo presente además una leucina en las posición 1049 en las muestras de órganos. De los 5 gatos con una metionina en la posición 1049 en las muestras de WBC, 2 tuvieron una leucina en esta posición en el(los) órgano(s) que contenía(n) lesiones por FIP, los otros 3 no tuvieron ninguna de las alteraciones de aminoácidos indicativas para FIPV. Por lo tanto, de los 31/34 (90%) gatos con FIP en los que se detectó una leucina en la posición 1049 en material de órganos, se detectó además leucina en esta posición en WBC en 29/31 (94%) casos.

Plasma:

14/34 (41%) de las muestras de plasma fueron positivas a FCoV. En 11/34 (32%) de los ARN derivados de plasma de gatos confirmados con FIP estuvo presente una leucina en la posición 1049 y una serina estuvo presente en la posición 1051. De los 3 gatos positivos a FCoV con una metionina en la posición 1049 en plasma, 1 tuvo una leucina en esta posición en el ARN de FCoV de órgano(s) que contenía(n) lesiones por FIP, los otros 2 no tuvieron ninguna de las alteraciones de aminoácidos indicativas para FIPV. Por lo tanto, de los 31/34 (90%) gatos con FIP en los que se detectó una leucina en la posición 1049 en material de órganos, se detectó además leucina en plasma en 11/31 (35%) casos.

Suero:

4/15 (27%) muestras de suero fueron positivas a FCoV. En 2/15 (13%) de los ARN derivados de suero de gatos confirmados con FIP estuvo presente una leucina en la posición 1049 y una serina estuvo presente en la posición 1051. 15/15 (100%) de estos gatos tuvo una leucina en la posición 1049 en el ARN de FCoV derivado de órganos.



Tabla 1. Iniciadores usados para la amplificación de la región objetivo del gen de la espícula de FCoV.

| Iniciador 5'-3'              | Posición en el gen de la espícula |  |
|------------------------------|-----------------------------------|--|
| CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA | 3642-3656                         | Iniciador inverso para la 1 <sup>ra</sup> corrida de RT-PCR  |
| CAATATTACAATGGCATAATGG       | 3055-3076                         | Iniciador directo para la 1 <sup>ra</sup> corrida de RT-PCR  |
| GGCATAATGGTTTTACCTGGTG       | 3067-3088                         | Iniciador directo para la 2 <sup>da</sup> corrida de RT-PCR* |
| TAATTAAGCCTCGCCTGCACTT       | 3188-3206                         | Iniciador inverso para la 2 <sup>da</sup> corrida de RT-PCR  |

Referencias

Barany, F. (1991) Genetic disease detection and DNA amplification using cloned thermostable ligase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 189-193.

Baron H, Fung S, Aydin A, Bähring S, Luft FC, Schuster H. Oligonucleotide ligation assay (OLA) for the diagnosis of familial hypercholesterolemia. Nat Biotechnol. 1996 oct;14(10):1279-82.

Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol. 1990 mar;28(3):495-503.

Brown MA, Troyer JL, Pecon-Slattery J, Roelke ME, O'Brien SJ. Genetics and pathogenesis of feline infectious peritonitis virus. Emerg Infect Dis. 2009;15(9):1445-52.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem. 1987 abr;162(1):156-9.

Compton, J. (1991) secuencia de ácido nucleico-based amplification. Nature 1991, 350:91-92.

Crain PF, McCloskey JA. Applications of mass spectrometry to the characterization of oligonucleotides and nucleic acids [Review]. Curr Opin Biotechnol 1998;9:25-34.

Day IN, Spanakis E, Palamand D, Weavind GP, O'Dell SD. Microplate-array diagonal-gel electrophoresis (MADGE) and melt-MADGE: tools for molecular-genetic epidemiology. Trends Biotechnol. 1998 jul;16(7):287-90.

Devereux J, Haerberli P, Smithies O. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res. 1984 enero 11;12(1 Pt 1):387.95.

Dye C, Siddell SG. Genomic RNA sequence of feline coronavirus strain FCoV C1Je. J Feline Med Surg. junio 1996;9(3):202-13.

Fakhrai-Rad H, Pourmand N, Ronaghi M. Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. Hum Mutat. 2002 mayo;19(5):479-85.

Fan, J.B., Chen, X., Halushka, M.K., Berno, A., Huang, X., Ryder, T., Lipshutz, R.J., Lockhart, D.J. and Chakravarti, A. (2000) Parallel genotyping of human SNPs using generic high-density oligonucleotide tag arrays. Genome Res., 10, 853-860.

Fehr D, Holznapel E, Bolla S, Hauser B, Herrewegh AA, Horzinek MC, Lutz H. Placebo-controlled evaluation of a modified live virus vaccine against feline infectious peritonitis: safety and efficacy under field conditions. Vaccine. 1997 jul;15(10):1101-9.

Fischer SG, Lerman LS. Separation of random fragments of DNA according to properties of their sequences. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980 ago;77(8):4420-4.

Guatelli, J.C., Whitf[jota]eld, K.M., Kwok, D.Y., Barringer, K. J., Richman, D.D., Gingeras, T.R. (1990) Isothermal, in vitro amplification of nucleic acids by a mutienzyme reaction modeled after retroviral replication. Proc. Natl. Acad. Sd. USA 87:1874-1878.

Haijema, B. J., P. J. Rottier, y R. J. de Groot. 2007. Feline coronaviruses: a tale of two-faced types, págs. 183-203. En V. Thiel (ed.), Coronaviruses. Molecular and cellular biology. Caister Academic Press, Norfolk, Reino Unido.

Kennedy, M., Boedeker, N., Gibbs, P., Kania, S. (2001) Deletions in the 7a ORF of feline coronavirus associated with an epidemic of feline infectious peritonitis. Vet. Microbiol. 81, 227-234.

Kwok, D.Y., Davis, G.R., Whitefield, K.M., Chappelle, H.L., DiMichele, L. J., Gingeras, T.R. (1989) Transcription-Based Amplification System and Detection of Amplified Human Immunodeficiency Virus Type 1 with a Bead- Based Sandwich Hybridization Format. Proc. Natl Acad. Sd. USA, 86, 1173- 1177.

- Lizardi, P.M., Guerra, C.E., Lomeli, H., Tussie-Luna, I., Kramer, F. r. (1988) Exponential amplification of recombinant RNA hybridization probes. *Biotechnology* 6, 1197-1202.
- Makino R, Yazyu H, Kishimoto Y, Sekiya T, Hayashi K. F-SSCP: fluorescence-based polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) analysis. *PCR Methods Appl.* 1992 ago;2(1):10-3.
- 5 McArdle F, Tennant B, Bennett M, Kelly DF, Gaskell CJ, Gaskell RM, Independent evaluation of a modified FIPV vaccine under experimental conditions (University of Liverpool experience). *Feline Pract.* 2005;23:67-71.
- Morlan J, Baker J, Sinicropi D. Mutation detection by real-time PCR: a simple, robust and highly selective method. *PLoS One.* 2009;4(2):e4584.
- 10 Motokawa K, Hohdatsu T, Hashimoto H, Koyama H. Comparison of the amino acid sequence and phylogenetic analysis of the peplomer, integral membrane and nucleocapsid proteins of feline, canine and porcine coronaviruses. *Microbiol Immunol.* 1996;40(6):425-33.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Meth. Enzymol.* 155:335-350.
- Pedersen NC. A review of feline infectious peritonitis virus infection: 1963-2008. *Feline Med Surg.* 2009 abr;11(4):225-58.
- 15 Poland AM, Vennema H, Foley JE, Pedersen NC. Two related strains of feline infectious peritonitis virus isolated from immunocompromised cats infected with a feline enteric coronavirus. *J Clin Microbiol.* 1996 dic.;34(12):3180-4.
- Rottier PJ, Nakamura K, Schellen P, Volders H, Haijema BJ. Acquisition of macrophage tropism during the pathogenesis of feline infectious peritonitis is determined by mutations in the feline coronavirus spike protein. *J Virol.* 2005 nov;79(22):14122-30.
- 20 Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain- terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5463-5467.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain- terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74:5463-5467.
- Vennema H, Poland A, Foley J, Pedersen NC. Feline infectious peritonitis viruses arise by mutation from endemic feline enteric coronaviruses. *Virology.* 1998 mar 30;243(1):150-7.
- 25 Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G., Malinowski, D. P. (1992) Strand displacement amplification - an isothermal, in vitro DNA amplification technique *Nucleic Acids Res* 20:1691-1696.

Reivindicaciones

- 5 1. Un método para determinar si está presente el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) en una muestra, que comprende determinar si dicha muestra comprende un coronavirus felino, y si un coronavirus felino está presente determinar la identidad de un aminoácido en una proteína de la espícula de dicho coronavirus felino en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1049 como se describe en la figura 2B, y determinar que FIPV está presente si dicho aminoácido es leucina.
- 10 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la identidad del aminoácido en la posición 1049 se determina al determinar una secuencia de ácido nucleico de un ácido nucleico del coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula, dicho ácido nucleico que comprende un nucleótido en, o que corresponde a, la posición 3145, 3146 y/o 3147 como se describe en la figura 2A.
- 15 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, que además comprende amplificar al menos parte de una molécula de ácido nucleico de coronavirus felino que comprende una región que incluye, o que corresponde a, la posición de nucleótidos 3145, 3146 y 3147 como se describe en la figura 2A mediante el uso de al menos un iniciador que es capaz de hibridarse a al menos parte de dicha secuencia de ácido nucleico entre una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3055 y una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3669 como se describe en la figura 2A.
- 20 4. Un método para determinar si está presente el virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV) en una muestra, que comprende determinar si dicha muestra comprende un coronavirus felino, y si está presente un coronavirus felino determinar la identidad de un aminoácido en una proteína de la espícula de dicho coronavirus felino en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B, y determinar que el FIPV está presente si dicho aminoácido es alanina.
- 25 5. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que además comprende determinar la identidad de un aminoácido en una proteína de la espícula de dicho coronavirus felino en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B, y determinar que el FIPV está presente si dicho aminoácido es alanina.
- 30 6. Un método de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, en donde la identidad del aminoácido en la posición 1051 se determina al determinar una secuencia de ácido nucleico de un ácido nucleico del coronavirus felino que codifica una proteína de la espícula, dicho ácido nucleico que comprende un nucleótido en, o que corresponde a, la posición 3151, 3152 y/o 3153 como se describe en la figura 2A.
- 35 7. Un método de acuerdo con la reivindicación 6, que además comprende amplificar al menos parte de una molécula de ácido nucleico del coronavirus felino que comprende una región que incluye, o que corresponde a, la posición de nucleótidos 3151, 3152 y 3153 como se describe en la figura 2A mediante el uso de al menos un iniciador que es capaz de hibridarse a al menos parte de dicha secuencia de ácido nucleico entre una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3055 y una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3669 como se describe en la figura 2A.
- 40 8. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 o 7, en donde dicho al menos un iniciador se selecciona de los iniciadores enumerados en la tabla 1.
- 45 9. Un par iniciador que comprende una secuencia de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia 5'-CCCTCGAGTCCCGCAGAAACCATACCTA-3' y una secuencia de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia 5'-CAATATTACAATGGCATAATGG-3'.
- 50 10. Un par iniciador que comprende una secuencia de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia 5'-GGCATAATGGTTTTACCTGGTG-3' y una secuencia de ácido nucleico aislada o recombinante que comprende una secuencia que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia 5'-TAATTAAGCCTCGCCTGCACTT-3'.
- 55

- 5
11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-8, en donde dicha secuencia de ácido nucleico se detecta mediante el uso de una sonda con una longitud de al menos 14 nucleótidos que es capaz de hibridarse específicamente a al menos parte de un ácido nucleico del coronavirus felino que comprende un nucleótido en, o que corresponde a, la posición 3145, 3146 y 3147 como se describe en la figura 2A, o que es capaz de hibridarse específicamente a al menos parte de un ácido nucleico del coronavirus felino que comprende un nucleótido en, o que corresponde a, la posición 3151, 3152 y 3153 como se describe en la figura 2A, dicha parte que tiene una longitud de al menos 14 nucleótidos.
- 10
12. Una sonda con una longitud de entre 14 y 100 nucleótidos, que comprende una secuencia de ácido nucleico que tiene al menos 90% de identidad de secuencia con la secuencia 5'-CCCARRGCCATAGG-3'.
- 15
13. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2-8 u 11, que además comprende la secuenciación de al menos parte de una secuencia de ácido nucleico de coronavirus felino, dicha parte comprende un nucleótido que corresponde a la posición de nucleótidos 3145, 3146 y/o 3147, o un nucleótido que corresponde a la posición de nucleótidos 3151, 3152 y/o 3153 como se representa en la figura 2A.
- 20
14. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, 4 o 5, en donde se detecta un aminoácido de una proteína de la espícula del coronavirus felino en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1049 o 1051 como se describe en la figura 2B al usar un anticuerpo o equivalente funcional de él dirigido específicamente contra un epítipo de una proteína de la espícula de FIPV, cuyo epítipo comprende un aminoácido distinto a la metionina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1049 o un aminoácido distinto a la serina en una posición que corresponde a la posición de aminoácidos 1051 como se describe en la figura 2B.
- 25
15. Una composición inmunogénica que comprende:
- una proteína de la espícula del coronavirus felino o parte inmunogénica de ella que comprende una alanina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B, o
  - un ácido nucleico de coronavirus felino codificador de una proteína de la espícula, que comprende una citosina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3145, y/o una guanina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3151 como se describe en la figura 2A,
- 30
- o una combinación de éstos.
- 35
16. Uso de:
- una proteína de la espícula del coronavirus felino o parte inmunogénica de ella que comprende una alanina en una posición que corresponde a la posición de aminoácido 1051 como se describe en la figura 2B, o
  - un ácido nucleico del coronavirus felino codificador de una proteína de la espícula, que comprende una citosina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3145, y/o una guanina en una posición que corresponde a la posición de nucleótido 3151 como se describe en la figura 2A,
- 40
- o una combinación de éstos, para la preparación de una composición inmunogénica o agente profiláctico para provocar una respuesta inmune contra un coronavirus felino, preferentemente un virus de la peritonitis infecciosa felina (FIPV), en un felino.
- 45

Figura 1

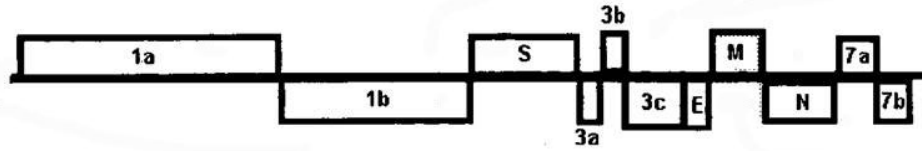


Figura 2A

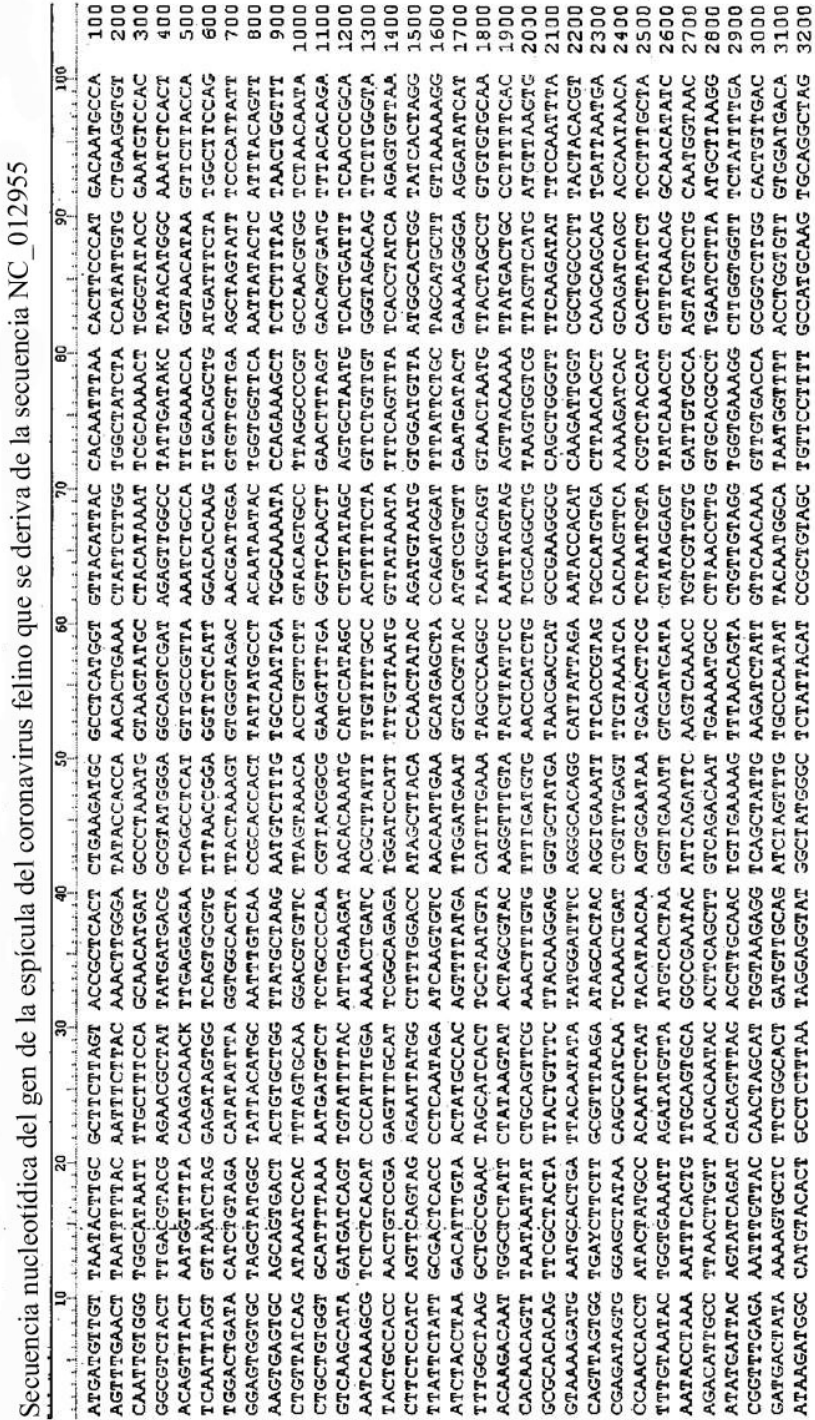


Figura 2A continuación

ACTTAACTAT GTCCGATTAC AAACCTGATGT ACTACAGSNA ACCCAGAAAA TACTTGCTAA TACTTTTAAT AATGCCATTG GTAACTATCAC ACTAGCGCTT 3300  
 GGAAAAGTTT CCAATGCTAT TACAACCATC TCAGATGGT TTAANTAGTAT GGCCTCAGCA TTGACTAAGA TTCAGAGTGT AGTTAATCAA CAGGTGAAG 3400  
 CGTTGAGTCA ACTTACCAGT CAGTTGCAGA AAAATTTCCA GGCANTAGT AGTTCTATTG CTGAAATTTA TAATPAGACTG GAAAAAGTAG AAGCTGATGC 3500  
 TCAAGTTGAC CGTCTCATTA CTGGTAGATT GGCAGCACTT ATAGCTAATG TGTCTCAAC TTAAGGCTAG TATGCTGAAG TTAAGGCTAG TAGGCAACTG 3600  
 GCAATGGAGA AAGTTAATGA GTGTGTTAAA TCTCAGTGG ATAGSTATGG GTTCTGTGCA AATGGAACAC ACCATTCTC ACTTGTCAAT TCTGCAACTG 3700  
 ATGGTTACT TTTCTTTTAC ACAGTGTAC TTCTACGGA ATGGGAAGAG GTGACGGCAI GGTCAAGAAI ATGTGTTAAT GACACATAIG CATATGTGT 3800  
 GAAAGACTTT GAATATTTCTA TTTTGTGCTA TAAFGGCACG TATATGGTAA CTCCTCGTAA FATGTTTCAA CCTAGAAAAC CTCAGATGAG TGATTCGTTG 3900  
 CAAATPACGA GTTGTGAGGT GACTTTTCTG AACACTACAT ATACGAAAT TCAAGAGATT GTGATTGATT ATATGACAT CAACAAGACT ATCGTTGATA 4000  
 TGCTTGAACA ATATAATCTT AATTACACAA CACCTGAAT ACATCTACAG CTGGAAATCT TTAATCAGAC AAGCTAACC CTCACCTGCAG AAATAGACCA 4100  
 ATTAGAACAA AGACGAGACA ACCTTACTAA TATAGCGCAT GAGCTACAGC AGTACATIGA CAACCTTAAT AAGAGCTTIG TTGACCTTGA ATGGCTCAAC 4200  
 AGGGTTGAAA CTTATGTAAA ATGGCCCTTGG TATGTGTGG TACTAATCGG ATTAGTAGTA GTATTCTGCA TACCATTGTT ACTGTTTTGC TGCTGAGTA 4300  
 CTGGCTGTTG TGGCTGTTT GGTGTGCTTG GAAGTTGTTG CAATTTCTTT TGTAGTAGAA GACAAATTTGA AAGTTACGAA CCCATCCGAA AGGTTTCACAT 4400  
 TCATTTAA 4407

Secuencia nucleotídica del gen de la espícula del coronavirus felino que se deriva de la secuencia NC\_012952

ATGATGTTGT TAATACTTGC GCTTCTTAGT ACCGCTCACT CTGAAGATGC GCCTCARGT GTTACATATAC CACAATTTAA CACTTCCCAT GGCAATGACA 100  
 AGTTTGAAC TAAATTTTAC AATTTCTTAC AAACCTGGGA TATACCACCA AACACTGAAA CTATTTTGG TGGCTATCTA CCATATTGTG CTGAAGGTGT 200  
 CAATTTGGGG TGGCAFAAT TTGCTTCCCA GCAACATGAT GCCCTAATG GTAAGTATGC CTACATAAAT TCGCAAAACT TGGGTATACC GAATGTCCAC 300  
 GCGGCTACT TTGACGTACG AGAAGCTAT TATGATGACG GCTATAGGGA TGCACTCGAT AGAGTTGGCC TATIGATAGC TATACATGCC AAATCTCACC 400  
 ACAGTTTACT AATGGTTTTA CAAGACAAG TTGAGGAGAA TCAGCCCTCAT GTTGGCGTTA AAATCTGCCA TTGGAACCA GTTAAACATA GTTCTTACCA 500  
 TCAATTTAGT GTTAACTTAG GAGATAETGG TCAGTCCGTG TTTAACCCGA GGTTCCTCAT GTGACAGCTG ATGGTTTCTA TGGCTTCCAG 600  
 TGGACTGATA CATCTGTAGA CATATATTTA GGTGGCATA TTAATAAATG TTAATAATAC CCGCACAACG TATTATAYT ACAATAATAC ATTATACAC ATTTGCASTT 700  
 AAGCGAGTGC AGTAGGAT ATTGTGCTGG TTAGTCTAAA AATGCTTIG TCCACTTGG TGGCAAGATA CCAGAGATT ATTCITTTAG TAACGTGTTT 800  
 CTGTTATCAG ACAATPCCAC TTTGGTGCAA GGACGTGTTTCT TTAGTAACA ACCTTCTTCT GTACAGTGC TTAGGCCGTG GCCAACGTTG TCTAACATA 1000  
 CTCGCTGTGT GCATTTTAAA AATGACETCT TCTGGCCAA CGTTACGSGG GAAGTTTGA GGTCAACTT GAACITTAGT GACAGTATG TTIACACAGA 1100  
 GTCGAAGCATA GATGATCAGT TGTATTTTAC AATTTGAAGT AACCAAAATG CATCCATATG CTTTATAGC AGTGGTAATG TCACTGATCT TCAACCCGCA 1200  
 AATCAAAAGCG TCTCTCACAT CCCATTTTGA AAAACTGATT ACGTTTATTT TTGTTTTGCC ACTTTTTCTA GTTCTCTTGT GGTAGAGAC TTCTTGGETA 1300  
 TACTKCCACC AACTGTCCGA GAGTTTGCAT TGGSCAGAGA TGGATCCATT TTTGTTAATG GTTATAAATA TTTCACTTAA CCACCIATCA AGAGTGTATA 1400

Figura 2A continuación

CTTCTCCATC AGTTCAGTAG AGAATTATGG CTTTTGGACC ATAGCTTACA CCAACTATAC AGATGTAATG GTGGATGTTA ATGGCACTGG TATCACTAGT 1500  
 TTATTTCTATT GCGACTCACCC CCTCAATAGA ATCAAGTCTC AACAAATGAA GCATGAGCTA CCAGATGGAT TTATTTCTGC TAGCATGCTT GTTAAAAAGG 1600  
 ATCTACCTAA GACATTTCTA ACTATGCCAC AGTTTTATGA TTGGATGAAT GTCACGTAC AIGTCTGTT GAATGATACT GAAAAGGGGA AGGATATCAT 1700  
 TTTGGCTAAG CTTGCCGGAAC TAGCATCACT TGTAAATGTA CATTGGAAC TAGCCGAGC TAATGGCAGT GTAACATAAG TACTAGCCT GTGTGTGCAA 1800  
 ACAAGACAAT TGGCTCTATT CTATAAGTAT ACTAGCTTAC AAGTTTIGTA IACTTATCC AATTTAGTAG AGTTACAAA TTATGACTGC CTTTTTTCAC 1900  
 CACAACAGTT TAAATAATAT CTGCACTTCG AAACCTTTG TTTGATGAG AACCCATCG TCGCAGCTG TAAGTGGTGG TTAGTTCAAG ATGTTAAGTG 2000  
 GCGCACACAG TTGCTACTA TTACTCTTIC TTACAAGGAG GGTGCTAIGA TAAAGCACAT GCCGAAGCC CAGCTGGGT TTCAAGATAT TTCCAATTTA 2100  
 GTAAGAATG AATGCACATGA TTACAATATA TATGGATTC AGGGCACAGG CATTATTAGA AATACCACCT CARGATTAGT ABCTGGCCTT TACTACACAT 2200  
 CCATTAGTGG TGACCTTCTT GCCTTTAAA ACAGTACTAC AGGTAATTT TICTACTGCG TCCCATGTGA TCTAACAGCA CAAGCAGCTG TGATTAACGA 2300  
 TCAATATGTC GGAGCTATAA CAGCCGTAA TCAACACAGAT CTGTTGAGT TTGTGATCA CACACAATCA AGAAGATCAC STAGSTCAAC CTCGGACACA 2400  
 GTAAAAACCT ATACTATGCC GCAATTTTAT TACATAACAA AGTGGAAATA TGACACCTTG ACTAATTTGA CGTCTGTCT TACATATCT TCCPTTGCTA 2500  
 TTTGTAATAC TGGTGAANT AAATATGTA ATGTCACATA GGTIGAAAT GGTGATGATA STATAGGAGT TATCAAACT GTTTCACAG GTTTCACATC 2600  
 AATACCTAAA AATTTCACTG TTGCACTGCA GCGCAATAC AATCAGATTC AAGTCAAACC TGCTGTGTG GATGTGTGTA AGTATGTTT TCAATCTTTG 2700  
 AGACATTTGCC TTACTTTTCT AACACAATAT ACTTCAGCTT CTCAAACAAT TGAANTGCC CTTAGCTTG GTCCACCTCT TCAATCTTTG AIGCTTAAAG 2800  
 AATGATTAC AGTATCAGAT CACAGTTAA AGCTTGCAAC TGTIGAAAG TTTAACAGTA CTGTTGTAGG TGGTAAAGG CTTGGTGGT AGTATGTTG 2900  
 CGGTTTGAGA GATTTGTTAC CACCTAGCAT TGGTAAGAGG TCAGTATITG AAGATCTATT GHTTAAATAA GTGTAACCA GCGTCTTGG CACTGTTGAT 3000  
 GATGATATA AAAAGTGCTC AGCTGTACT GCATCCTTAA TAGGAGGCAT GATTTGAG ATCTAGTTG TGCCAGTAT TACAATGGTA TAAATGGTIT ACCTGGCGTC 3100  
 ATAAGATGGC CATGTATACT CATCTTAA CAGTGTGAGT GCTCTGAGT TCTATTACAT CAGCTCTCG CGTCCCTTT GCTAIGCAAAG TACAGCTAG 3200  
 ACTTAACTAT GTCCATAC AAACIGATGT ACTACAGAA AACCAAAA TACTTGCTAA CGCTTTAAT AATGCCATG STAACATAC ACTAGGCTT 3300  
 GGAAGAATTT CCAATGCTAT TACAACATA TCAGATGGT TTAATATAT GGCCTCAGCA TTGACTAAGA TFCAGAGTGT AGTTAATCAA CAGGTGAAG 3400  
 CGTTGAGTCA ACTTACCAGT CAGTTCAGA AAAATTTCCA GGCATTAGT AGTCTATG TGTCTAAC TTTAACTCAG TATGCTGAG TAAAGGCTAG TAGGCAACTG 3500  
 TCAASTTGAC CGTCTCATA CTGGTAGATT GGCAGCACTT AATGCTTAG TGTCTAAC ATGGCAAC ACCTATCTC AATGTCAT TCTGCACTG 3600  
 GCAATGGAGA AAGTAAATGA GTGTGTTAA TCTCAGTGG ATAGGTAGG GTTCTGGA AATGGAACAC ACCTATCTC ACTTGTCAAT TCTGCACTG 3700  
 ATGGTTACT TTTCTTTTAC ACAGTCTAC TCTCAGTGG ATGGAGAG GTACGCGCAT GTCACGGAT GTCAGSAAT ATGTGTTAAT GACACATATG CATATGTTG 3800  
 GAAAGACTTT GAATATCTA TTTTGTAGTA TAATGGTAG TATATGGTAA CTCCTGTAA TATGTTCAA CTAAGABAC CTCAGATGAG TGAATTCGTG 3900  
 CAAATACGA GATGTGAAT GACTTTCTG AACACTAC ATACGACTT ATACGACTT GTGATGAT ATATTGAT TAACAAGACT ATCGTGATA 4000  
 TGCTTGACCA ATATAATCT AATTACAAA CACTGAAAT AGATTTACAG ATAGAAATTT TCAACAGAC AAAGTTAAC CTCACITGAG AAATAGACCA 4100  
 ATAGAACAG CGAGCTGACA ACCTCACAC TATAGCAGT GAGTACAGC AGTACATTGA CAATCTAAT AAGACGCTAG TTGACCTCGA ATGGCTCAAC 4200  
 AGGATGAAA CTTATGTAAT ATGGCCTTGG TATGTGfGG TACTGATCG ATTAGTAGTA GATTTCTGCA TACCATTGTT ACTGTTTGG TGTCTGAGTA 4300  
 CTGGCTGTTG TGGTGTITTT GCTTGTCTTG GAAATGTTTG CAATCTCTT TGTAGTAGAA GACAATTTGA AAGTACGAA CCAATCGAAA AGGTTCCAT 4400  
 TCATPAA



Figura 2B

YP\_003038574

```

i mmlilalalls tahsedaphg vtipqfntsh dnakfelny nflqtwdipp ntetilggyl
61 pycaegvncg whnfafqhd alngkyayin sqnlgipnvh gvyfdvrery yddgvweavd
121 rvgllixihg kshysllmvl qdnxeenqph vavkichwkp gnissyhqfs vnlgdsgqcv
181 fnrrfsltdk ltaddfygfq wtdtsvdiyl ggtitkvwd ndwsvveasi shywsgasyg
241 yymqfvnrtt yyaynntggs nythlqlsec ssdycagyak nvfvpidgki pesfsfnwf
301 llsdkstlvq grvlskqpvl vqclrpvptw snntavvhfk ndvfcpnvta evlrfnlfnfs
361 dsdvytessi ddqlyftfed ntnasiacys sanvtdfqp nqsvshipfg ktdhayfcfa
421 tfsssvvgrq flgilpvtvr efafgrdgsi fvngykyfsl spiksvnfsi ssvenygfw
481 iaytnytdvm vdvngtgitr lfycdsplnr ikcqqkhel pdgfysasml vkkdldpctfv
541 tmpqfydwmn vtlhvvlndt ekgkdiilak aaelaslanv hfeiaqangs vtnvtslcvq
601 trqlalfyky tsvqglytys nlvelqnydc pfspqqfnny lqfeticfdv npsvagckws
661 lvhdvkwrtq fatitvsyke gamittmpka qlgfqdisnl vkdectdyni ygfqgtgiir
721 ntsrlvagl yytsvsgdll afknsttgei ftvvpclta qaavindeiv gaitainqtd
781 lfefvntss krsrrsapit ptytmpqfy yitkwnndts snctstitys sfaicntgei
841 ryvntkvei vddsivgikp vstgnisipk nftvavqaey iqiqvkvvv dcakvvcngn
901 rhcltlltqy tsacqtiena lnlgarlesl mlkdmitsvd hslelatvek fnstvvger
961 lggfyfdglr nllptsigr saiedllfnk vvtsglgtvd ddykkcssgt dvadlvcaqy
1021 yngimvlpvg vddnkamyt asliggmamg sitsavavpf amqvqarlly valqtdvlqe
1081 ngkilanafn naignitlal gkvsnaitti sdgfnmasa ltkiqsvvnq qgealsqlts
1141 qlqknfqais ssiaeynrl ekveadaqvd rlitgrlaal nayvsqtlq yaevkasrql
1201 amekvncvk sqsdrygfcg ngthlflslvn sapdglffh tvllptewee vtawsgicvn
1261 dtyayvlkdf eysifsyngt ymvtprnmfv prkpmmsdfv qitscevtfl ntytkfqi
1321 vidyidinkt ivdmleqynp nyttpelhlq leifnqtkln ltaeidqle radnitniah
1381 elqqyidnln ktlvdlwln rvetyvkwpp yvlliglv vfciplllfc clstgcccfcf
1441 gclgscnsl csrrqfesy piekvhih

```

YP\_003038543

```

i mmlilalalls tahsedaphg vtlpqnsh gndkfelny nflqtwdipp ntetifggyl
61 pycaegvncg whnfafqhd alngkyayin sqnlgipnvh gvyfdvrery yddgvwdavd
121 rvgliaihg kshysllmvl qdnveenqph vavkichwkp gnissyhqfs vnlgdsgqcv
181 fnrrfsltdk ltadgygfyq wtdtsvdiyl ggtitkvwd ndwsvveasi shfwsgtsyg
241 yymqfvnrtt yxyntlgs nythlqlsec ssdycagyak nvfvpvggki pesysfnwf
301 llsdkstlvq grvlskqpvl vqclrpvptw snntavvhfk ndvfcpnvta evlrfnlfnfs
361 dsdvytessi ddqlyftfed ntnasiacys sanvtdlqpa nqsvshipfg ktdyayfcfa
421 tfsssvvgrq flgilpvtvr efafgrdgsi fvngykyfsl ppiksvnfsi ssvenygfw
481 iaytnytdvm vdvngtgits lfycdsplnr ikcqqkhel pdgfysasml vkkdldpctfv
541 tmpqfydwmn vtlhvvlndt ekgkdiilak aaelaslanv hfeiaqangs vtnvtslcvq
601 trqlalfyky tslqglytys nlvelqnydc pfspqqfnny lqfeticfdv npsvagckws
661 lvhdvkwrtq fatitvsyke gamittmpka qlgfqdisnl vkdectdyni ygfqgtgiir
721 ntsrlvagl yytsisgdl afknsttgei ftvvpclta qaavindeiv gaitavnqtd
781 lfefvntqs rrsrrstsd vkytmpqfy yitkwnndtl tnctsvitys sfaicntgei
841 kyvntkvei vddsivgikp vstgnisipk nftvavqaey iqiqvkvvv dcakvvcngn
901 rhcltlltqy tsacqtiena lslgarlesl mlkdmitsvd hsklatvek fnstvvger
961 lggfyfdglr dlppsigkr sviedllfnk vvtsglgtvd ddykkcsagt dvadlvcaqy
1021 yngimvlpvg vddnkamyt asliggmalg sitsavavpf amqvqarlly valqtdvlqe
1081 ngkilanafn naignitlal gkvsnaitti sdgfnimasa ltkiqsvvnq qgealsqlts
1141 qlqknfqais ssiaeynrl ekveadaqvd rlitgrlaal nayvsqtlq yaevkasrql
1201 amekvncvk sqsdrygfcg ngthlflslvn sapdglffh tvllptewee vtawsgicvn

```

**Figura 2B continuación**

1261 dtyayvlkdf eysifsyngt ymvtpnrnmfq prxpqmsdfv qitrcevtfl nttyttfqi  
1321 vidyidinkt iadmleqynp nyttpeldlq ieifnqtln ltæidqleq radnlttiar  
1381 elqqyidnln ktlvdlæwln rietyvkwpw yvlliglvv vfciplllfc clstgcccfc  
1441 gclgscnsl csrrqfesye piekvhih

**Figura 3**

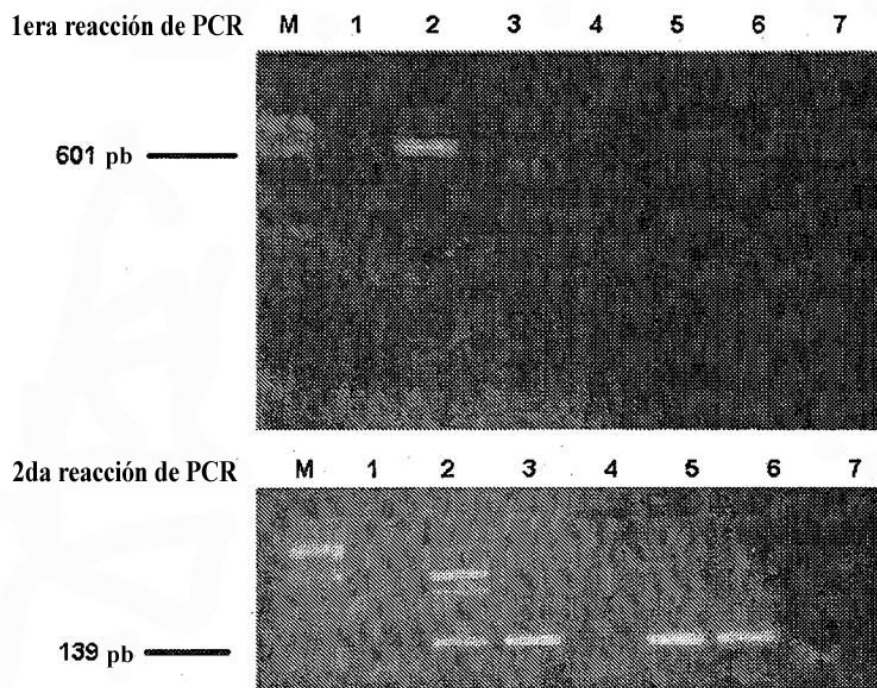












Figura 4C

a.a. 1049

|     |     | Núm. FIPV |                |
|-----|-----|-----------|----------------|
| M   | A   | M         | T01461019_23F  |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | T01461041_74F  |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | P01471007_205F |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | T01461008_107F |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | T03001010_131F |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | T03001024_149F |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | T01461031_150F |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | T03001019_171F |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | T03001023_188F |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| X   | A   | M         | T01461033_205F |
| ..G | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | 283F           |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | 288F           |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | 307F           |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |
| M   | A   | M         | 230            |
| ATG | GCT | ATG       | GCT            |