

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 538 189**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.08.2010 E 10752901 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.01.2015 EP 2470676**

54 Título: **Procedimientos de ensayo para MDV-1**

30 Prioridad:

25.08.2009 GB 0914826

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

17.06.2015

73 Titular/es:

**ZOETIS W LLC (100.0%)
100 Campus Drive
Florham Park NJ 07932, US**

72 Inventor/es:

**BAIGENT, SUSAN;
NAIR, VENUGOPAL y
LE GALLUDEC, HERVE**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 538 189 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

Procedimientos de ensayo para MDV-1

5 La presente invención se refiere a procedimientos de ensayo y, en particular, a procedimientos para el análisis de los niveles de cepas de vacuna y los niveles de cepas virulentas de virus, en concreto, del virus de la enfermedad de Marek de serotipo 1 (MDV-1), en muestras de aves.

Antecedentes

10 El virus de la enfermedad de Marek (MDV) es un herpesvirus que provoca la enfermedad linfoproliferativa en los pollos. Incluso tras la introducción de vacunas contra el MDV, la infección sigue causando considerables pérdidas en la industria avícola. El MDV se divide en tres serotipos, estableciendo todos ellos infecciones latentes. El serotipo 1 incluye virus oncogénicos, el serotipo 2, virus no oncogénicos, y el serotipo 3 incluye los herpesvirus del pavo (HVT) (Bülow y col., (1976) Zentralblatt für Veterinärmedizin, 23B, 391-402).

Handberg y col., (2001) "Avian Pathology" 30: 243-249 describen el uso de PCR específica del serotipo 1 y serotipo 3 para la detección del MDV en los pollos. Las muestras de tejido se tomaron de sangre (glóbulos de la capa leucocítica), bazo, hígado, piel, puntas de pluma y ovarios.

15 La cepa CVI988 (Rispens), un serotipo 1 del MDV atenuado de manera natural (MDV-1), se introdujo a mediados de la década de los noventa (Rispens y col., (1972) "Avian Diseases", 16, 108-125; De Boer y col., (1986) "Avian Diseases", 30, 276-283) y, hasta la fecha, es la vacuna más eficaz contra el MDV. Sin embargo, incluso a la luz de los programas de vacunación, los brotes de MDV siguen causando pérdidas significativas. Estos brotes pueden tener varias causas, entre las que se incluyen: la inhibición por los anticuerpos maternos de la replicación del virus de la vacuna (King y col., (1981) "Avian Diseases", 25, 74-81; de Boer y col., (1986) *supra*); la supresión de la respuesta inmunitaria a la vacuna por tensiones ambientales o coinfecciones con patógenos inmunosupresores; la infección con una cepa virulenta de MDV antes del establecimiento de la inmunidad vacunal completa; la infección de aves vacunadas y completamente inmunocompetentes con una cepa de MDV hipervirulenta (Witter y col., (2005) "Avian Pathology", 34, 75-90.); y, por último, la administración de dosis de vacuna insuficientes que no producen inmunidad protectora.

25 Como tal, es importante poder medir con precisión la vacuna contra el MDV y el virus de desafío (virulento) de forma individual, incluyendo la medición de una o ambas variables en el mismo pollo tanto por razones experimentales como comerciales. A nivel experimental, es muy útil poder examinar las interacciones entre la vacuna y el virus de desafío con vistas a comprender mejor el mecanismo de protección vacunal y las diferencias de eficacia entre las vacunas. A nivel comercial, es importante ayudar a identificar las causas de los fallos de la vacuna, tales como la administración de una dosis subóptima de vacuna (Landman y Verschuren, 2003), la interferencia con la replicación del virus de la vacuna por los anticuerpos maternos (King *et al*, 1981; de Boer y col., (1986) y la infección con cepas de campo de MDV hipervirulentas (Witter y col., 2005).

35 Se ha desarrollado un ensayo de PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real altamente sensible para la cuantificación absoluta del MDV-1 en los tejidos de pollo (Baigent y col., 2005a), y se ha usado con mucho éxito para investigar la cinética de la replicación del virus de la vacuna CVI988 en los tejidos de polluelos experimentales y comerciales en ausencia de infección por el virus de desafío (Baigent y col., 2005b, 2006). Sin embargo, este procedimiento no puede distinguir entre CVI988 y el virus de desafío. Otros grupos han desarrollado ensayos de PCR en tiempo real para cuantificar el MDV-2 (Renz y col., 2006) y MDV-3 (herpesvirus de los pavos) (Islam y col., 2006a). Estos ensayos específicos del serotipo se pueden usar para cuantificar tanto el virus de la vacuna como el virus de desafío virulento en cada pollo, donde el virus de desafío (siempre MDV-1) es de un serotipo diferente al virus de la vacuna (MDV-2 o -3) (Islam y col., 2006b).

45 Sin embargo, la vacuna contra el MDV más ampliamente usada y eficaz es una cepa del serotipo 1 atenuada de forma natural (CVI988, Rispens) (Rispens y col., 1972; de Boer y col., 1986) y, hasta la fecha, no ha sido posible la PCR en tiempo real para distinguir el virus de desafío del virus de serotipo 1 de la vacuna, ya que las diferencias de secuencia entre ellos son muy limitadas. Se puede usar una diferencia en el número de repeticiones de la región de repetición de 132 pb para distinguir CVI988 de cepas virulentas usando la PCR convencional (Becker y col., 1992; Silva, 1992). Sin embargo, la naturaleza repetitiva de esta región impide su uso en la PCR cuantitativa. Las diferencias en el gen *meq* y el gen ICP4 no son uniformes entre CVI988 y las cepas virulentas. También se ha desarrollado un sistema de qPCR (Baigent, sin publicar) para distinguir entre MDV-1 clonado en BAC (cromosomas artificiales bacterianos) y MDV-1 de tipo silvestre mediante la dirección de la secuencia específica de BAC del MDV-1 clonado en BAC y el gen US2 del MDV-1 de tipo silvestre, pudiéndose usar este para distinguir entre cepas de la vacuna clonadas en BAC y cepas virulentas de tipo silvestre, pero solo cuando dichas cepas de vacuna están clonadas en BAC. Cabe señalar que dicho procedimiento no se pudo usar a nivel comercial, dado que no hay vacunas de MDV-1 comerciales clonadas en BAC.

55 El gen pp38 muestra una diferencia uniforme de un solo nucleótido entre la cepa de la vacuna CVI988 y las cepas virulentas de MDV-1. Sin embargo, resulta difícil diseñar cebadores de qPCR que sean capaces de distinguir dicha pequeña diferencia.

Descripción de la invención

La presente invención proporciona procedimientos para cuantificar las cepas de MDV-1 de vacuna y/o virulentas del serotipo 1 del virus de la enfermedad de Marek en aves, basándose en un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) en el gen pp38. Estos procedimientos también incluyen procedimientos de cuantificación de las cantidades relativas y/o absolutas de las cepas de vacuna y virulentas, y la determinación del número de copias de cada cepa.

En un primer aspecto, la invención proporciona un procedimiento de cuantificación de una cepa de vacuna del serotipo 1 del virus de la enfermedad de Marek (MDV-1) en una muestra de un ave, que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una muestra biológica que se haya obtenido del ave;

(ii) someter la muestra biológica de (i) a PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real, que comprende:

(a) la amplificación de una región del gen pp38 dentro de la muestra de ácido nucleico de (i), conteniendo dicha región una diferencia de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre las cepas de vacuna y virulenta del MDV-1; y siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b)); y

(b) la puesta en contacto del ácido nucleico amplificado de (a) con una sonda de ácido nucleico detectable específica del SNP de la cepa virulenta de MDV-1;

(iii) medir los cambios en la señal detectable producida por la sonda de (ii).

En un segundo aspecto, la invención proporciona un procedimiento de cuantificación de una cepa virulenta del serotipo 1 del virus de la enfermedad de Marek (MDV-1) en una muestra de un ave, que comprende las etapas de:

(i) proporcionar una muestra biológica que se haya obtenido del ave;

(ii) someter la muestra biológica de (i) a PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real, que comprende:

(a) la amplificación de una región del gen pp38 dentro de la muestra de ácido nucleico de (i), conteniendo dicha región una diferencia de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre las cepas de vacuna y virulenta del MDV-1; y siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b)); y

(b) la puesta en contacto del ácido nucleico amplificado de (a) con una sonda de ácido nucleico detectable específica del SNP de la cepa virulenta de MDV-1;

(iii) medir los cambios en la señal detectable producida por la sonda de (ii).

En un tercer aspecto, la invención proporciona un procedimiento de cuantificación de una cepa de vacuna y una cepa virulenta del serotipo 1 del virus de la enfermedad de Marek (MDV-1) en una muestra de un ave, que comprende las etapas de:

(i) proporcionar muestras biológicas que se hayan obtenido del ave;

(ii) someter las muestras biológicas de (i) a PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real, que comprende:

(a) la amplificación de una región del gen pp38 dentro de la muestra de ácido nucleico de (i), conteniendo dicha región una diferencia de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre las cepas de vacuna y virulenta del MDV-1; y siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b)); y

(b) la puesta en contacto del ácido nucleico amplificado de (a) con una sonda de ácido nucleico detectable específica del SNP de la cepa de vacuna y una segunda sonda de ácido nucleico específica del SNP de la cepa virulenta de MDV-1;

(iii) medir los cambios en la señal detectable producida por cada sonda de (ii); y, opcionalmente,

(iv) comparar los cambios en la señal detectable medida en (iii) para cada sonda específica.

En una realización de la invención, la cuantificación de las cepas virulenta y de vacuna puede ser una cuantificación relativa.

Los procedimientos de la invención pueden incluir opcionalmente la etapa de aislar el ácido nucleico de la muestra biológica de la etapa (i) y someter el ácido nucleico aislado a la qPCR de la etapa (iii).

La muestra biológica proporcionada por el ave puede comprender ácido nucleico del ave o ácido nucleico aislado del ave (es decir, puede incluir tanto ácidos nucleicos del ave como ácido nucleico de otras fuentes procedentes del ave - por ejemplo, un virus). En una realización de la invención, la muestra biológica proporcionada se obtiene de los siguientes tejidos: sangre, bazo, hígado, piel, ovarios, bursa, timo, riñón o puntas de pluma de aves individuales (Baigent y col., (2005a) *Journal of Virological Methods*, 23, 53-64; Baigent y col., (2005b) *Journal of General Virology*, 86, 2989-2998). El uso de puntas de pluma proporciona un medio de muestreo de aves en el campo, y es

el procedimiento más sencillo y menos invasivo.

El gen pp38 codifica una fosfoproteína que desempeña un papel importante en la patogénesis del MDV. El gen pp38 ha demostrado ser necesario para establecer la infección citolítica en los linfocitos B, producir un nivel adecuado de linfocitos T infectados de forma latente y mantener el estado transformado *in vivo*. (Gimeno y col., 2005).

- 5 Un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) es una variación de la secuencia de ADN que ocurre cuando un solo nucleótido (A, T, C o G) del genoma (u otra secuencia compartida) difiere entre los miembros de una especie o entre pares de cromosomas de un individuo o, como en este caso, entre las cepas de vacuna y virulenta de MDV-1. Por ejemplo, dos fragmentos de ADN secuenciados de diferentes individuos, AAGCCTA a AAGCTTA, contienen una diferencia en un solo nucleótido. En este caso, se dice que hay dos alelos, el polimorfismo C y el polimorfismo T.
- 10 Casi todos los SNP comunes tienen solo dos alelos.

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, también denominada reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (Q-PCR/qPCR) o reacción en cadena de la polimerasa cinética, es una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y se usa tanto para amplificar como para cuantificar material genético diana. La qPCR permite tanto la detección como la cuantificación (como cantidad relativa o número absoluto de copias cuando se normaliza con respecto a la entrada de ADN o genes de normalización adicionales) de una secuencia específica de una muestra de ADN. La qPCR sigue el procedimiento general de la PCR con la característica adicional de que se cuantifica el ADN amplificado que se va acumulando en tiempo real tras cada ciclo de qPCR. Dicha cuantificación se puede realizar mediante procedimientos comunes con agentes fluorescentes que se intercalan con el ADN que se va acumulando o sondas de ácidos nucleicos modificadas complementarias a la secuencia de ADN amplificada que producen una señal detectable al unirse con el ADN que se va acumulando. Por lo tanto, la qPCR es un procedimiento ampliamente usado y muy útil para detectar y cuantificar una determinada secuencia de ácido nucleico de una muestra. Los procedimientos de qPCR son bien conocidos por los expertos en la materia, y se describen en libros de texto tales como Sambrook y Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Volúmenes 1, 2 y 3 (2001, III edición).

15

20

25 En el presente documento, se proporciona un procedimiento de detección de las cepas de vacuna y/o virulenta de MDV-1 en una muestra de ácido nucleico por medio de la PCR en tiempo real (qPCR) y el uso de un agente tal como una sonda de ácido nucleico capaz de producir una señal detectable al unirse con el ácido nucleico producido durante la qPCR. Dicha señal detectable se puede proporcionar convenientemente mediante el marcaje de la sonda con un colorante fluorescente tal como JUP, que tiene una longitud de onda detectable en el canal de detección de VIC del instrumento de qPCR.

30

Para lograr la especificidad en un ensayo de dúplex (es decir, un ensayo con dos formas de ácido nucleico por detectar), en general, la especificidad se requiere a tres niveles:

(1) Especificidad del producto de PCR: en la presente invención, se usa un par de cebadores universales, complementarios a una región conservada del gen pp38 y, por consiguiente, se amplificarán ambas cepas CVI988 y virulenta de MDV-1 por igual y, como tal, no hay especificidad a este nivel.

35

(2) Especificidad de la sonda: en la presente invención, hay una buena especificidad de la sonda, ya que ambas sondas se unen mínimamente al producto PCR desapareado, en lugar de unirse específicamente a la cepa de vacuna o virulenta de MDV-1.

(3) Especificidad del detector: en la presente invención, no hay interrelación entre los canales de detección de la reacción convencional conocida y la reacción de pp38 y, como tal, se logra dicha especificidad del detector.

40

La señal detectable producida durante la qPCR se puede proporcionar mediante el marcaje de la sonda con cualquier agente capaz de producir una señal detectable, tal como un agente fluorescente, tal como un colorante fluorescente, por ejemplo, MAR, JUP, NEP, SAT, URA, FAM, HEX, TET, VIC, JOE, TAMRA, bromuro de etidio, LC Green, SYBR Green I, YO-PRO-1, BEBO y SYTO9; un cromóforo, tal como un colorante cromóforo, por ejemplo, Cy3, Cy5, Pyr(10)PC; o un par de colorantes cromóforos adecuados para su uso en el análisis FRET, por ejemplo, el par de colorantes TOTO 1 y TOTO 3.

45

En una realización adicional de la invención, la cuantificación de la/s cepa/s es una cuantificación absoluta. En una realización de la invención, las qPCR de la etapa (ii) comprenden además una qPCR convencional conocida concomitante (reacción de normalización), en la que se utiliza una sonda marcada con una señal detectable diferente para permitir la cuantificación absoluta de las cepas atenuada y/o virulenta. La señal detectable permite la detección de la señal producida en un canal de detección separado del instrumento de qPCR. En una realización, este sistema de qPCR convencional es la reacción Ovo, que usa el gen huésped Ovo presente en el ADN de pollo y puede usar convenientemente la señal detectable FAM-BHQ1 (disponible de proveedores tales como Eurogentec). Dicha reacción de normalización permite comparar de manera exacta las muestras teniendo en cuenta la cantidad de ADN usado en la reacción. Ovo es un gen presente en el ADN de pollo, y dos copias del gen Ovo equivalen a una célula, por lo que se puede usar la curva patrón de Ovo para calcular el valor Ct de Ovo, que equivale a 10.000 células. Para las muestras de ensayo, se usa una curva patrón producida usando ADN de CVI988 y la reacción específica de CVI988 para calcular el número de copias (del valor Ct específico de CVI988) de CVI988

50

55

- de la muestra, mientras que una curva patrón producida usando ADN de RB-1 B y la reacción específica de la cepa virulenta se usa para calcular el número de copias (del valor Ct específico de la cepa virulenta) de MDV virulento en la muestra. La curva patrón de Ovo se usa para averiguar el número de copias de Ovo (del valor Ct de Ovo) de la muestra. El número de copias de Ovo (es decir, el número de células) será diferente en las diferentes muestras, por lo que, para que sea posible comparar con exactitud la muestra A con la muestra B, se calculan cuántas copias de MDV habría en cada muestra si esas muestras tuvieran 10.000 células.
- Con el uso de la señal proporcionada por la sonda de ácido nucleico anteriormente mencionada, se puede cuantificar la cantidad de ADN amplificada por cada ciclo en comparación con el patrón conocido. Se produce un valor de ciclo umbral (Ct) para permitir la comparación de las cantidades relativas de ADN producidas para diferentes muestras. Este valor Ct es una medida eficaz del ciclo de la qRT-PCR, donde la señal producida pasa más allá de un valor umbral de fondo.
- Esta medición se determina mediante el trazado de las concentraciones relativas de ADN presente durante la fase exponencial de la reacción de PCR (medida como fluorescencia) frente al número de ciclo en una escala logarítmica (por lo que una cantidad en aumento exponencial dará una línea recta). Se determina un umbral para la detección de la fluorescencia por encima del fondo y el ciclo en el que la fluorescencia de una muestra cruza el umbral es el ciclo umbral, Ct.
- En otras palabras, el valor Ct se define como el número de ciclo al nivel umbral de la fluorescencia en base logarítmica (es decir, la fluorescencia más baja observada por encima de los niveles de fondo). Este es el valor observado y medido en experimentos de PCR en tiempo real (qPCR).
- La producción de una señal detectable en una qPCR con cada una de las sondas específicas (una específica de la cepa de vacuna atenuada y una específica de una cepa virulenta de MDV-1) permite la determinación relativa de la cantidad de cepa de vacuna y de cepa virulenta de MDV-1 en la muestra nucleica proporcionada de un ave específica. Esto es posible porque las sondas de ácidos nucleicos tienen una secuencia complementaria a la secuencia específica bien de la cepa de vacuna o de la cepa virulenta de MDV-1 y, por consiguiente, solo se unirán a una de las cepas específicas. En la realización de la invención que incluye un patrón conocido, se pueden calcular los valores Ct como se describe, y usarse en la cuantificación absoluta de la cepa específica del virus producido en la reacción de qPCR, siendo posible dicha comparación de la cantidad de cada cepa.
- En una realización de la invención, la cepa de vacuna de MDV-1 es una vacuna atenuada y, en una realización adicional, la cepa de vacuna es la vacuna atenuada CVI988.
- Las vacunas virales son formas muertas, inactivadas o atenuadas de virus o productos purificados derivados de los mismos, y se administran a un sujeto con el fin de inducir una respuesta inmune hacia dicho virus sin que el sujeto experimente los efectos negativos habituales ni la enfermedad causados por el virus en su forma virulenta. Tras dicha respuesta inmune, se crea la inmunidad en el sujeto contra la exposición al patógeno en su forma virulenta.
- Se pueden usar varios tipos de vacunas, y representan diferentes estrategias usadas para intentar reducir el riesgo de la enfermedad, mientras que conservan la capacidad de inducir una respuesta inmune beneficiosa. Las vacunas virales usadas comúnmente pertenecen a las categorías de las vacunas muertas, vacunas atenuadas, vacunas toxoides, vacunas subunitarias y vacunas conjugadas.
- Las vacunas atenuadas contienen virus vivos atenuados; estos son virus vivos que se pueden replicar. Se dan en la naturaleza en una forma no virulenta, o se han cultivado en condiciones que desactivan sus propiedades virulentas o que usan organismos estrechamente relacionados, pero menos peligrosos para producir una respuesta inmune amplia. Por lo general, provocan respuestas inmunológicas más duraderas que otras formas de vacunas.
- En una realización de la invención, las sondas son complementarias a una secuencia de pp38 que lleva incorporada la región de hasta 30 pares de bases alrededor del SNP.
- En una realización particular de la invención, las sondas pueden contener dentro de una secuencia más larga o comprender únicamente las siguientes secuencias o un fragmento de las mismas:
- sonda específica de la cepa de vacuna: 5' CCCACCGTGACAGCC 3'
- sonda específica de la cepa virulenta: 5' CCCACTGTGACAGCC 3'; o
- una segunda sonda específica de la cepa virulenta: 5' CTCCCACTGTGACAGCC 3.
- En un aspecto adicional de la invención, se proporciona un procedimiento en el que la qPCR de la etapa (ii) comprende además el uso de una sonda de ácido nucleico "total" en la etapa (ii) capaz de detectar tanto la cepa de vacuna como la cepa virulenta. Dicha sonda total es útil como control, pues la cantidad de virus detectada por la sonda total debe ser igual a la suma de virus detectados tanto por la sonda específica de la cepa de vacuna como por la sonda específica de la cepa virulenta en sus qPCR específicas.

En un aspecto particular de la invención, la sonda total específica de ambas cepas puede contener dentro de una secuencia más larga o comprender únicamente la siguiente secuencia o un fragmento de la misma:

5' GCTACCGCCTGAGCC 3'.

5 Los cebadores usados en la qPCR amplificarán una región que lleva incorporado el polimorfismo de un solo nucleótido y, como tales, se pueden usar en combinación con cualquiera de las sondas de ácido nucleico descritas anteriormente. En una realización preferida de la invención, los cebadores directo e inverso usados en la amplificación de la muestra de ácido nucleico pueden contener dentro de una secuencia más larga o comprender únicamente las siguientes secuencias o un fragmento de las mismas:

Cebador directo: 5' GAGCTAACCGGAGAGGGAGA 3'

10 Cebador inverso: 5' CGCATACCGACTTTCGTCAA 3'.

15 Los polinucleótidos de la invención también proporcionan polinucleótidos que incluyen secuencias de nucleótidos que son sustancialmente equivalentes a los polinucleótidos enumerados anteriormente. Los polinucleótidos de acuerdo con la invención pueden tener, por ejemplo, al menos aproximadamente el 65 %, al menos aproximadamente el 70 %, al menos aproximadamente el 75 %, al menos aproximadamente el 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, más normalmente, al menos aproximadamente el 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, más normalmente, al menos aproximadamente el 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, e incluso más normalmente al menos aproximadamente el 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % de identidad de secuencia con un polinucleótido citado anteriormente.

20 Los polinucleótidos de la invención incluyen además el complemento de cualquiera de los polinucleótidos citados anteriormente. El polinucleótido puede ser ADN (genómico, ADNc, amplificado o sintético) o ARN. Los procedimientos y algoritmos para la obtención de dichos polinucleótidos son bien conocidos por los expertos en la materia, y pueden incluir, por ejemplo, procedimientos de determinación de las condiciones de hibridación que pueden aislar rutinariamente polinucleótidos de las identidades de secuencia deseadas.

25 Los oligonucleótidos como los usados en la presente invención se pueden producir mediante procedimientos habituales para los expertos en la materia, y que se describen en libros de texto tales como "Ch10 Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (Sambrook y Russell, 2001).

30 Como se ha descrito, la especificidad de las sondas usadas se debe a un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme en el gen pp38 entre las cepas atenuada y virulenta de MDV-1. En una realización de la invención, las sondas usadas para detectar este SNP son sondas fluorogénicas homomarcadas que comprenden dos colorantes indicadores idénticos que son capaces de inactivarse entre sí y volverse a activar una vez escindida la sonda. Preferentemente, dichas sondas son minisondas AllGlo (AlleLogic Biosciences Corp, Hayward, CA).

35 Las minisondas AllGlo son nuevas sondas fluorogénicas homomarcadas. A diferencia de las sondas Taqman doblemente marcadas convencionales, las minisondas AllGlo se componen de dos colorantes indicadores idénticos que son capaces de inactivarse entre sí y volverse a activar una vez que se escinde la sonda. Por lo tanto, la escisión de la sonda produce la liberación de dos colorantes generadores de señal por sonda, aumentando la sensibilidad de detección en comparación con las sondas Taqman.

40 Las minisondas AllGlo son significativamente más cortas que las sondas doblemente marcadas convencionales (por ejemplo, de 15 a 16 nucleótidos). La longitud acortada hace más eficaz la inactivación y genera líneas basales de baja fluorescencia. La especificidad es superior a la de las sondas Taqman, de modo que una minisonda AllGlo puede detectar una sola mutación puntual. Las minisondas AllGlo se usan preferentemente con los colorantes fluorescentes MAR, JUP, NEP, SAT o URA disponibles en Allelogic Biosciences.

En una realización de la invención, la cepa virulenta de MDV-1 se selecciona entre RB1B MDV, 584A MDV, 595 MDV, 684A MDV, Md5 MDV, HPRS-B14 MDV, JM102 MDV, 660A MDV, 675A MDV, 549 MDV, 571 MDV o C12-130 MDV.

45 En un aspecto, el procedimiento de la invención se puede usar en el diagnóstico de la infección con MDV-1 virulento en aves independientemente de si se han vacunado previamente o no, por ejemplo, con una cepa de vacuna atenuada. Dado que el procedimiento tiene la capacidad de monitorizar simultáneamente el comportamiento de la cepa de vacuna y la cepa virulenta, sería el procedimiento de diagnóstico de elección en situaciones tales como la identificación de la causa de los fallos de la vacuna y, en un aspecto adicional, el procedimiento se puede usar como una herramienta de investigación en el desarrollo y/o ensayo de vacunas contra el MDV-1. El procedimiento puede ser particularmente útil en situaciones comunes en las que no se sabe si un ave está infectada con ambas cepas de vacuna y virulenta, antes de ensayar cualquiera de las cepas.

50 En una realización, la invención se puede proporcionar como un kit de piezas que comprende:

(i) cebadores que amplificarán una región del gen pp38 que porta un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre la cepa de vacuna y la cepa virulenta de MDV-1, siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado

en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b); y

(ii) una sonda de ácido nucleico marcada para el polimorfismo de pp38 específico de la cepa de vacuna de MDV-1.

En una realización adicional, la invención se puede proporcionar como un kit de piezas que comprende:

- 5 (i) cebadores que amplificarán una región del gen pp38 que porta un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre la cepa de vacuna y la cepa virulenta de MDV-1, siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b); y
(ii) una sonda de ácido nucleico marcada para el polimorfismo de pp38 específico de las cepas virulentas de MDV-1.

10 En una realización adicional, la invención se puede proporcionar como un kit de piezas que comprende:

- (i) cebadores que amplificarán una región del gen pp38 que porta un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre la cepa de vacuna y la cepa virulenta de MDV-1, siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b);
(ii) una sonda de ácido nucleico marcada para el polimorfismo de pp38 específico de la cepa de vacuna; y
15 (iii) una sonda de ácido nucleico marcada para el polimorfismo de pp38 específico de cepas virulentas de MDV-1.

En realizaciones adicionales, el kit de piezas puede incluir opcionalmente reactivos de qPCR convencionales y/o una qPCR convencional conocida que utiliza una sonda marcada con una señal detectable diferente. En una realización, la cepa de vacuna cuantificada por el kit de piezas es la vacuna CVI988.

20 En una realización adicional, la/s sonda/s de ácido nucleico del kit de piezas puede contener dentro de una secuencia más larga o comprender únicamente las siguientes secuencias o un fragmento de las mismas:

sonda específica de la cepa de vacuna: 5' CCCACCGTGACAGCC 3'

sonda específica de la cepa virulenta: 5' CCCACTGTGACAGCC 3'.

El kit de piezas puede comprender además una sonda total que se une tanto a la cepa de vacuna como a la cepa virulenta que, en una realización, tiene la siguiente secuencia:

25 5' GCTACCGCCTGAGCC 3'.

Realizaciones preferidas

A continuación, se describirán ejemplos que incorporan ciertos aspectos de la invención con referencia a las siguientes figuras, en las que:

30 La **Figura 1** muestra la ubicación de unión de los cebadores **subrayados en negrita** y de las sondas **en negrita** en el gen pp38 para (a) CVI988 (cepa de la vacuna) y (b) Md5 (cepa virulenta representativa). Las sondas que se unen al polimorfismo **G/A** uniforme son las sondas específicas, la otra sonda es la sonda total. El polimorfismo **G/A** no es uniforme en todas las cepas virulentas.

35 La **Figura 2** muestra la especificidad de cada una de las dos minisondas para (a) CVI988 (cepa de la vacuna) y (b) RB1B (cepa virulenta representativa) mediante el trazado del cambio en la fluorescencia frente al número de ciclo de la qPCR.

40 La **Figura 3** muestra las curvas patrón de ADN del valor Ct frente al número de copias de los fibroblastos de embrión de pollo (FEP) infectados, producidas para las siguientes reacciones de qPCR: (a) sonda de CVI988 (cepa de la vacuna) con ácido nucleico de FEP infectados por CVI988 (cepa de la vacuna); (b) sonda de RB1B (cepa virulenta representativa) con ácido nucleico de FEP infectados por RB1 B (cepa virulenta representativa); (c) sonda de doble especificidad con ácido nucleico de FEP infectados por CVI988 (cepa de la vacuna); y (d) sonda de doble especificidad con ácido nucleico de FEP infectados por RB1B (cepa virulenta representativa). Los valores del número de copias se produjeron mediante la calibración de los resultados de fluorescencia producidos con aquellos producidos a partir del plásmido de ADN de número de copias conocido.

45 La **Figura 4** muestra la especificidad de las sondas de ácido nucleico para la vacuna HVT de MDV de serotipo 3, vacuna SB-1 de MDV de serotipo 2, fuentes diferentes de vacuna CVI988 de MDV-1 y para cepas virulentas de MDV-1 de diferente virulencia en un intervalo de 12 cepas virulentas diferentes de MDV-1. Se indican los serotipos (1, 2 o 3) y los patotipos (v, w o vv+) para cada una de las cepas de MDV-1. (v = virulenta, vv = muy virulenta, vv+ = muy extra-virulenta).

50 La **Figura 5** muestra la curva patrón producida para la reacción qPCR de Ovo usando una sonda de Ovo marcada con FAM-BHQ1 y diluciones en serie calibradas de ADN de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) no infectados.

La **Figura 6** muestra el mapa génico de MDV-1 y la ubicación de los genes pp38 y US2 clave dentro de la vacuna CVI988 y el virus de desafío RB1B.

La **Figura 7** muestra la comparación de las curvas patrón de los valores Ct frente al número de copias de las células infectadas producidas en las siguientes reacciones de qPCR: (a) sonda de CVI988 (cepa de la vacuna) con ácido nucleico de FEP infectados por CVI988 (cepa de la vacuna); (b) sonda de RB1B (cepa virulenta representativa) con ácido nucleico de FEP infectados por RB1B (cepa virulenta representativa) en comparación con las producidas a partir de las reacciones equivalentes en el procedimiento de qPCR de BAC/US2.

La **Figura 8** muestra el número de copias producido para 40 aves usando sistemas de qPCR específicos del virus de la vacuna clonado en BAC (columna 1), virus virulento/de desafío (columna 2) y virus total (columna 3), y la comparación de la qPCR de la presente invención frente a la qPCR basada en BAC/US2 para cada uno. Las aves se indican en función de su pertenencia a los cuatro siguientes grupos: 1) las no vacunadas, no desafiadas; 2) vacunadas, no desafiadas; 3) vacunadas, desafiadas; y 4) no vacunadas, desafiadas.

La **Figura 9** muestra la correlación de los niveles de virus medidos entre la qPCR de la presente invención y el sistema de qPCR de BAC/US2 para (a) virus de la vacuna y (b) virus virulento.

La **Figura 10** muestra (a) la correlación de los niveles de virus medidos entre la qPCR total (de doble especificidad) y el resultado aditivo de la especificidad hacia el virus de la vacuna y de la especificidad hacia el virus virulento para la qPCR de la presente invención; (b) la correlación de los niveles de virus medidos entre el resultado aditivo de la especificidad hacia el virus de la vacuna y de la especificidad hacia el virus virulento para la qPCR de la presente invención y el resultado aditivo del sistema de qPCR de BAC/US2; y (c) la correlación entre los niveles de virus medidos entre la qPCR total (de doble especificidad) de la presente invención y el resultado aditivo del sistema de qPCR de BAC/US2.

Ejemplo 1: Diseño de cebadores y sondas de qPCR

La secuencia del gen pp38 del MDV muestra dos diferencias de un solo nucleótido entre la vacuna CVI988 atenuada y Md5 (una cepa virulenta) (Figura 1). El polimorfismo destacado en **mayúsculas subrayadas en negrita (G/A)** representa una diferencia uniforme entre el virus de la vacuna MDV-1 y los virus virulentos MDV-1 para todos de los que se dispone de secuencia (RB1B MDV, 584A MDV, 595 MDV, 684A MDV, Md5 MDV, HPRS-B14 MDV, JM102 MDV, 660A MDV, 675A MDV, 549 MDV, 571 MDV, C12-130 MDV) y este fue el polimorfismo que se incorporó en las sondas específicas. El polimorfismo destacado **en cursiva subrayado en negrita (G/A)** no se encuentra presente sistemáticamente en todas las cepas de virus virulento. La Tabla 1 enumera las secuencias de los cebadores junto con las dos sondas (pp38Vacc_G_JUP específica de la vacuna atenuada CVI988; y pp38Vir_A_JUP (1) específica de los virus virulentos) que se diseñaron para cubrir la región polimórfica. También se diseñó una tercera sonda pp38-total_JUP dirigida a una región común a pp38 de todas las cepas de MDV-1. Las tres sondas se pueden usar en combinación con el mismo par de cebadores (véase la Tabla 1).

La Tabla 1 también muestra una segunda sonda (pp38Vir_A_JUP (3)) dirigida específicamente a los virus virulentos, que se diseñó para que las tres sondas, la específica de la vacuna, la específica de los virus virulentos y la de pp38 total, tuvieran una temperatura de fusión similar. El rendimiento de pp38Vir_A_JUP (3) es muy similar al de pp38Vir_A_JUP(1) (la otra sonda específica de la cepa virulenta). Sin embargo, debido a que cubre el segundo sitio polimórfico "no uniforme", es posible que se pueda reducir la afinidad por algunas cepas de campo (véase la Figura 1 y la Tabla 1). Las sondas se marcan con el colorante JUP (AlleLogic Biosciences), que se detecta en el canal de detección de VIC del instrumento de PCR en tiempo real.

Tabla 1

	PCR de pp38 específica de MDV1 CVI988	qPCR de pp38 específica de MDV1 virulento	qPCR de pp38 total
Cebador directo	<u>GAGCTAACCGGAGAGGGAGA</u>	<u>GAGCTAACCGGAGAGGGAGA</u>	<u>GAGCTAACCGGAGAGGGAGA</u>
Cebador inverso	<u>CGCATACCGACTTTTCGTCAA</u>	<u>CGCATACCGACTTTTCGTCAA</u>	<u>CGCATACCGACTTTTCGTCAA</u>
Sondas disponibles	CCCACCGTGACAGCC	CCCACCGTGACAGCC	GCTACCGCCTGAGCC
	pp38Vacc G JUP Tm = 57,7	pp38Vir A JUP(1) Tm = 54,1	pp38-total JUP Tm = 57,4
		<u>C_TCCCAC_TGTGACAGCC</u>	
		pp38Vir_A_J_U P(3) (*) Tm = 57,1	
Cadena de la sonda	-	-	+
Tamaño amp.	99 pb	99 pb	99 pb

Los cebadores y las sondas fueron diseñados y fabricados por AlleLogic Biosciences, Hayward, CA, EE.UU.

Ejemplo 2: Infección de fibroblastos de embrión de pollo (FEP)

Los fibroblastos de embrión de pollo (FEP) se infectaron bien con la cepa de la vacuna CVI988 o la cepa virulenta RB1B de MDV-1. Cinco días después de la infección, se prepararon diluciones en serie de estas células para su uso en qPCR singleplex.

Se establecieron monocapas celulares de FEP (fibroblastos de embrión de pollo) en matraces de cultivo de 75 cm² y se infectaron con aproximadamente 1.000 unidades formadoras de placa (ufp) de virus asociado a las células. Tras 5 días en cultivo a 38 °C, se recogieron las células y se preparó ADN usando el procedimiento de extracción con fenol-cloroformo. Las reacciones eran un volumen de 25 ul y contenían: mezcla maestra de qPCR Absolute Blue (ABgene), 400 nM de cada cebador (es decir, cebadores Ovo + cebadores específicos del virus), 200 nM de cada sonda (es decir, sonda Ovo + sonda específica del virus), muestra de ADN de aproximadamente 100 ng. Las reacciones se realizaron en una máquina de PCR en tiempo real ABI7500 usando los parámetros de ciclación: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 15 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C (15 s) y 60 °C (1 min).

Ejemplo 3: Especificidad de las qPCR: reacciones singleplex

Se establecieron las reacciones esencialmente como se ha descrito anteriormente (Baigent y col., 2005a), conteniendo cada una mezcla maestra de qPCR ABSolute (ABgene, Epsom, RU), cebador directo e inverso y una de las sondas. Se usó un sistema qPCR ABI 7500FAST[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE.UU.) para amplificar y detectar los productos de reacción, en las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 15 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C (15 s) y 60 °C (1 min). En la Tabla 2, se muestran las combinaciones de cebador y sonda para cada qPCR singleplex.

Tabla 2

	PCR de pp38 específica de MDV1 CVI988	qPCR de pp38 específica de MDV1 virulento
Cebador directo	<u>GAGCTAACCGGAGAGGGAGA</u>	<u>GAGCTAACCGGAGAGGGAGA</u>
Cebador inverso	<u>CGCATACCGACTTTCGTCAA</u>	<u>CGCATACCGACTTTCGTCAA</u>
Sonda	CCCACCGTGACAGCC pp38Vacc_G_JUP Tm = 57,7	CCCACCTGTGACAGCC pp38Vir_A_JUP(1) Tm = 54,1

La especificidad de las sondas se evaluó inicialmente mediante el uso de diluciones en serie de 10 veces de ADN preparado a partir de fibroblastos de embrión de pollo (FEP), cinco días después de la infección bien con CVI988 o RB1B (una cepa virulenta de MDV-1).

La Figura 2 demuestra el cambio en la fluorescencia producido por (a) la sonda específica de CVI988 y (b) la sonda específica de las cepas virulentas usando el molde de ácido nucleico bien de CVI988 o RBIB (una cepa virulenta) o control sin molde. Los datos muestran claramente que la señal solo se produce a niveles significativos cuando se usa la sonda específica del ácido nucleico en la qPCR, y se demuestra claramente la especificidad de las sondas como tal.

Ejemplo 4: Curvas patrón para la qPCR

Se prepararon patrones de ADN a partir de células FEP infectadas con CVI988 y de células FEP infectadas con RB-1B. y se cuantificaron con precisión por calibración contra ADN plasmídico de número de copias conocido. Se prepararon diluciones en serie de diez veces. La Figura 3(a) muestra la curva patrón producida usando qPCR específica de CVI988 en ADN de CVI988. La Figura 3(b) muestra la curva patrón producida usando qPCR específica de las cepas virulentas en ADN de RB-1B. La Figura 3(c) muestra la curva patrón producida usando qPCR de pp38 total en ADN de CVI988. La Figura 3 (d) muestra la curva patrón producida usando qPCR de pp38 total en ADN de RB-1B.

Todas las reacciones tuvieron una buena eficacia y produjeron una buena curva patrón. La sonda de pp38 total detectó ADN de CVI988 (vacuna) y ADN de RB-1B (virulenta), y con una eficacia similar a la predicha. Los pocillos de control sin molde fueron negativos para todas las sondas.

Ejemplo 5: Especificidad de las sondas de ácido nucleico de pp38 para una selección de cepas de MDV-1

Se ensayó la especificidad de la sonda pp38Vir_A_JUP (específica de las cepas virulentas) y las sondas pp38Vacc_G_JUP (específicas de la vacuna CVI988) en una selección de 12 cepas de MDV-1 de virulencia variable, una selección de 3 fuentes diferentes de cepa de vacuna de MDV-1 CVI988 y 2 cepas de vacuna de serotipo distinto a 1 (Figura 4).

Los umbrales (ΔR_n) se fijaron en: reacción de Ovo (0,2), reacción de pp38 específica de las cepas virulentas (0,6), reacción de pp38 específica de CVI988 (0,35), reacción de pp38 total (0,1). La sonda específica de las cepas virulentas detectó todas las cepas virulentas de MDV1 (pero no detectó CVI988), y la sonda de específica de la vacuna solo detectó CVI988, pero de las 3 fuentes. Ninguna sonda detectó las cepas de vacuna de MDV-2 y de MDV-3 SB-1 y HVT. Los datos confirman la especificidad uniforme de pp38Vacc_G_JUP hacia la cepa de vacuna CVI988 de MDV-1 de diferentes fuentes y la especificidad de pp38Vir_A_JUP hacia las cepas virulentas de MDV-1 de diferente virulencia. Los datos también muestran la especificidad de ambas sondas hacia las cepas de MDV-1 frente a las cepas de MDV-2 o MDV-3.

Ejemplo 6: Adaptación de los ensayos para la cuantificación absoluta

Para usar las reacciones qPCR de minisonda para la cuantificación absoluta del virus de la vacuna y de desafío en muestras de tejido (expresada como genomas virales por 10^4 células), era necesario optimizar la duplexación de las reacciones de pp38 con la reacción de Ovo. Se marcó la sonda de Ovo con FAM-BHQ1 para que fuera detectada en un canal diferente a la fluorescencia de la sonda de pp38. El amplicón diana de la qPCR de Ovo es de 71 pares de bases y, en la siguiente Tabla 3, se muestran las secuencias usadas de los cebadores y de la sonda. Los cebadores y las sondas fueron producidos por Sigma Aldrich y Eurogentec.

Tabla 3

Gen de la ovotransferrina del pollo (Jeltsch y col., 1987)	Cebador directo de Ovo	CACTGCCACTGGGCTCTGT	71 pb
	Cebador inverso de Ovo	GCAATGGCAATAAACCTCAA	
	Sonda de Ovo	AGTCTGGAGAAGTCTGTGCAGCCTCCA (marcador FAM en 5'; marcador BHQ en 3')	

Dos copias del gen Ovo equivalen a una célula, por lo que la curva patrón de Ovo se puede usar para calcular el valor Ct de Ovo, que equivale a 10.000 células. La reacción específica del ADN de CVI988 se usa para calcular el número de copias (a partir del valor Ct específico de CVI988) de CVI988 en la muestra, mientras que una curva patrón producida usando ADN de RB-1B y la reacción específica de la cepa virulenta se usa para calcular el número de copias (a partir del valor Ct específico de la cepa virulenta) de MDV virulento en la muestra. La curva patrón de Ovo se usa para averiguar el número de copias de Ovo (a partir del valor Ct de Ovo) en la muestra. El número de copias de Ovo (es decir, el número de células) será diferente en las diferentes muestras, por lo que, para poderse comparar con exactitud la muestra A con la muestra B, se calcula el número de copias de MDV que habría en cada muestra si dichas muestras tuvieran 10.000 células.

La curva patrón para la reacción de Ovo se preparó usando diluciones en serie calibradas de ADN de FEP no infectados, y se muestra en la Figura 5.

Ejemplo 7: Ensayo y validación de la qPCR dúplex en muestras de ADN de pollo

Dado que el par de cebadores amplificará el ADN de MDV-1 tanto CVI988 como virulento, estas dos secuencias diana competirán por los mismos cebadores cuando ambas secuencias diana estén presentes. Las muestras de los experimentos de laboratorio y de campo contendrán MDV-1 CVI988 y virulento en diversas proporciones. Para confirmar que la competencia por los cebadores no impide la amplificación (y, por tanto, la detección) del virus menos abundante cuando uno de los virus esté presente a niveles elevados y el otro solo a niveles bajos, se examinó la capacidad de las reacciones para cuantificar con exactitud MDV-1 tanto CVI988 como virulento en muestras mixtas.

Se tomaron muestras de ADN de tejidos de pollo de un experimento en el que los pollos habían sido vacunados con un virus CVI988 clonado en BAC (pCVI988) y desafiado con RB-1B. Los cuatro grupos de polluelos fueron: (1) no vacunado, no desafiado; (2) vacunado, no desafiado; (3) vacunado y desafiado; (4) no vacunado, desafiado. Se extrajeron muestras de bazo en varios puntos temporales posteriores a la vacunación y al desafío. El virus de la vacuna fue pCVI988 y el virus de desafío (virulento) fue WT RB-1B, lo que debería permitir la distinción entre los dos virus tanto mediante el sistema de pp38 de CVI988/pp38 virulento como mediante un segundo sistema de qPCR desarrollado por los inventores para distinguir entre MDV clonado en BAC (usando una secuencia específica de BAC) y MDV de tipo natural (dirigiéndose al gen US2). Por lo tanto, este último sistema de qPCR se podría usar para validar el sistema de qPCR de pp38 de CVI988/pp38 virulento. También se midió el virus total usando la reacción de pp38 total. En la Tabla 4, se muestra un plan para la validación del sistema de qPCR, que se indica en los mapas de genes virales de la Figura 6.

Tabla 4

	Diana del sistema de qPCR de pp38 con minisonda	Diana del sistema de qPCR convencional
1.000 ufp de MDV de vacuna, 1 d, pCVI988 i.m.	Secuencia de pp38 específica de CVI988	Secuencia de BAC
1.000 ufp de MDV de desafío, 15 d, RB-1B i.p. (vvMDV-1)	pp38 específico de MDV1 virulento	Secuencia de US2
MDV total	pp38 total	-

Cada una de las cinco reacciones qPCR específicas del virus que se muestra en la Tabla 4 se realizó en dúplex con la qPCR de Ovo para permitir la cuantificación absoluta del virus por cada 10.000 células. Las Figuras 7(a) y 7(b) muestran las curvas patrón usadas para la cuantificación del virus de la vacuna y virulento usando ambos sistemas de qPCR.

La Figura 8 muestra el nivel de MDV de la vacuna, de desafío y total medido en 40 aves, distribuidas en cuatro grupos: 1) no vacunadas, no desafiadas; 2) vacunadas, no desafiadas; 3) vacunadas, desafiadas; y 4) no vacunadas, desafiadas. Las muestras con un valor de línea basal (0,6) son negativas.

Las dos primeras columnas muestran la medición del virus de la vacuna mediante qPCR de pp38 específica de CVI (columna 1) y qPCR específica de BAC (columna 2). En ambos sistemas, el virus de la vacuna solo se detectó en los dos grupos vacunados. La coincidencia entre los valores de número de copias obtenidos con los dos sistemas fue buena (véase también la Figura 9(a)).

Las columnas 3 y 4 muestran la medición del virus de desafío mediante qPCR de pp38 específica de cepas virulentas (columna 3) y qPCR específica de US2 (columna 4). En ambos sistemas, solo se detectó el virus de desafío en los dos grupos desafiados. La coincidencia entre los valores de número de copias obtenidos con los dos sistemas fue buena (véase también la Figura 9(b)).

Las columnas 5, 6 y 7 muestran la medición del MDV total mediante qPCR de pp38 para medir ambos virus (columna 5), los resultados aditivos de qPCR de pp38 específica de CVI y qPCR de pp38 específica de cepas virulentas (columna 6) y los resultados aditivos de la qPCR específica de BAC y la qPCR específica de US2 (columna 7). La coincidencia entre los valores del número de copias obtenidos con estos tres sistemas fue buena (Figuras 10 (a), (b) y (c)).

Estos datos confirman que la qPCR de pp38 de CVI y la qPCR de pp38 de MDV1 virulento muestran una excelente especificidad, y se pueden usar para cuantificar con exactitud las cepas de MDV-1 de la vacuna CVI988 y virulentas en muestras de tejido, incluyendo las que contienen ambos virus en cantidades biológicamente relevantes.

Referencias

- Baigent, S. J., Petherbridge, L. J., Howes, K., Smith, L. P., Currie, R. J., Nair, V. K., 2005a. "Absolute quantitation of Marek's disease virus genome copy number in chicken feather and lymphocyte samples using real-time PCR". *J. Virol. Methods* 23, 53-64.
- Baigent, S. J., Smith, L. P., Currie, R. J., Nair, V. K., 2005b. "Replication kinetics of Marek's disease vaccine virus in feathers and lymphoid tissues using PCR and virus isolation". *J Gen Virol.* 86, 2989-2998.
- Baigent, S. J., Smith, L. P., Nair, V. K., Currie, R. J., 2006. "Vaccinal Control of Marek's Disease: Current challenges, and future strategies to maximize protection". *Vet. Immunol. Immunopathol.* 112, 78-86.
- Becker Y, Asher Y, Tabor E, Davidson I, Malkinson M, Weisman Y: "Polymerase chain reaction for differentiation between pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDV) and vaccine viruses of MDV-serotypes 2 and 3". *J Virol Methods* 1992; 40:307-322.
- de Boer, G. F., Groenendal, J. E., Boerrigter, H. M., Kok, G. L., Pol, J. M., 1986. "Protective efficacy of Marek's disease virus (MDV) CVI-988 CEF65 clone C against challenge infection with three very virulent MDV strains". *Avian Dis.* 30, 276-283.
- Islam, A., Cheetham, B. F., Mahony, T. J., Young, P. L., Walkden-Brown, S. W., 2006a. "Absolute quantitation of Marek's disease virus and Herpesvirus of turkeys in chicken lymphocyte, feather tip and dust samples using real-time PCR". *J. Virol. Methods* 132, 127-134.
- Gimeno I. M., Witter R. L., Hunt H. D., Reddy S. M., Lee L. F., Silva R. F., "The pp38 gene of Marek's disease virus (MDV) is necessary for cytolytic infection of B cells and maintenance of the transformed state but not for cytolytic infection of the feather follicle epithelium and horizontal spread of MDV". *J Virol.* Abril de 2005; 79(7):4545-9.
- Islam, A. F., Walkden-Brown, S. W., Islam, A., Underwood, G. J., Groves, P. J., 2006b. "Relationship between Marek's disease virus load in peripheral blood lymphocytes at various stages of infection and clinical Marek's disease in broiler chickens". *Avian Pathol.* 35, 42-48.
- King, D., Page, D., Schat, K. A., Calnek, B. W., 1981. "Difference between influences of homologous and heterologous maternal antibodies on response to serotype-2 and serotype-3 Marek's disease vaccines". *Avian*

Dis. 25, 74-81.

10. Landman, W. J., Verschuren, S. B., 2003. "Titration of Marek's disease cell-associated vaccine virus (CVI 988) of reconstituted vaccine and vaccine ampoules from Dutch hatcheries". *Avian Dis.* 47, 1458-1465.
- 5 11. Renz, K. G., Islam, A., Cheetham, B. F., Walkden-Brown, S. W., 2006. "Absolute quantification using real-time polymerase chain reaction of Marek's disease virus serotype 2 in field dust samples, feather tips and spleens". *J. Virol. Methods.* 135, 186-191.
12. Rispens, B. H., Van Vloten, J., Mastenbroek, N., Maas, H. J. L., Schat, K. A., 1972. "Control of Marek's disease in the Netherlands. I. Isolation of an avirulent Marek's disease virus (strain CVI 988) and its use in laboratory vaccination trials". *Avian Dis.* 16, 108-125.
- 10 13. Silva R. F., "Differentiation of pathogenic and non-pathogenic serotype 1 Marek's disease viruses (MDVs) by the polymerase chain reaction amplification of the tandem direct repeats within the MDV genome". *Avian Dis* 1992; 36: 521-528.
14. Sambrook y Russell: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Volumen 1-3 (2001, III Ed).

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de cuantificación de una cepa de vacuna del serotipo 1 del virus de la enfermedad de Marek (MDV-1) en una muestra de un ave, que comprende las etapas de:
 - 5 (i) proporcionar una muestra biológica que ha sido obtenida del ave;
 - (ii) someter la muestra biológica de (i) a PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real, que comprende:
 - (a) la amplificación de una región del gen pp38 dentro de la muestra de ácido nucleico de (i), conteniendo dicha región una diferencia de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre las cepas de vacuna y virulenta del MDV-1; y siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b)); y
 - 10 (b) la puesta en contacto del ácido nucleico amplificado de (a) con una sonda de ácido nucleico detectable específica del SNP de la cepa virulenta de MDV-1;
 - (iii) medir los cambios en la señal detectable producida por la sonda de (ii).
2. Un procedimiento de cuantificación de una cepa virulenta del serotipo 1 del virus de la enfermedad de Marek (MDV-1) en una muestra de un ave, que comprende las etapas de:
 - 15 (i) proporcionar una muestra biológica que ha sido obtenida del ave;
 - (ii) someter la muestra biológica de (i) a PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real, que comprende:
 - (a) la amplificación de una región del gen pp38 dentro de la muestra de ácido nucleico de (i), conteniendo dicha región una diferencia de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre las cepas de vacuna y virulenta del MDV-1; y siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b)); y
 - 20 (b) la puesta en contacto del ácido nucleico amplificado de (a) con una sonda de ácido nucleico detectable específica del SNP de la cepa virulenta de MDV-1;
 - (iii) medir los cambios en la señal detectable producida por la sonda de (ii).
3. Un procedimiento de cuantificación de una cepa de vacuna y una cepa virulenta del serotipo 1 del virus de la enfermedad de Marek (MDV-1) en una muestra de un ave, que comprende las etapas de:
 - 25 (i) proporcionar muestras biológicas que han sido obtenidas del ave;
 - (ii) someter las muestras biológicas de (i) a PCR cuantitativa (qPCR) en tiempo real, que comprende:
 - (a) la amplificación de una región del gen pp38 dentro de la muestra de ácido nucleico de (i), conteniendo dicha región una diferencia de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre las cepas de vacuna y virulenta del MDV-1; y siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b)); y
 - 30 (b) la puesta en contacto del ácido nucleico amplificado de (a) con una sonda de ácido nucleico detectable específica del SNP de la cepa de vacuna y una segunda sonda de ácido nucleico específica del SNP de la cepa virulenta de MDV-1;
 - 35 (iii) medir los cambios en la señal detectable producida por cada sonda de (ii); y, opcionalmente, incluir la siguiente etapa posterior a la etapa (iii);
 - (iv) comparar los cambios en la señal detectable medida en (iii) para cada sonda específica.
4. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en la que el procedimiento incluye opcionalmente la etapa de aislar el ácido nucleico de la muestra biológica de la etapa (i) y someter el ácido nucleico aislado a la qPCR de la etapa (ii).
5. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que las qPCR de la etapa (ii) comprenden además una qPCR convencional conocida simultánea que utiliza una sonda marcada con una señal detectable distinta para permitir la cuantificación absoluta de las cepas de la vacuna y/o virulentas.
6. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que las sondas son complementarias a una secuencia de pp38 que tiene incorporada la región de hasta 30 pares de bases en torno al SNP.
7. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que las sondas pueden contener dentro de una secuencia más larga o comprender únicamente las siguientes secuencias o un fragmento de las mismas:
 - sonda específica de la cepa de vacuna: 5' CCCACCGTGACAGCC 3';
 - sonda específica de la cepa virulenta: 5' CCCACTGTGACAGCC 3'; o
 - 50 una segunda sonda específica de la cepa virulenta: 5' CTCCCACTGTGACAGCC 3.
8. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la qPCR de la etapa (ii) comprende además el uso

de una sonda de ácido nucleico "total" de la etapa (ii) capaz de detectar las cepas tanto de vacuna como virulentas; en el que la sonda total específica de ambas cepas puede contener opcionalmente dentro de una secuencia más larga o comprender únicamente la siguiente secuencia o un fragmento de la misma.

5' GCTACCGCCTGAGCC 3'.

5 9. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que las sondas usadas son sondas fluorogénicas homomarcadas que comprenden dos colorantes indicadores idénticos que son capaces de inactivarse entre sí y volverse a activar una vez que la sonda se ha escindido.

10 10. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que los cebadores usados en la amplificación de la muestra de ácido nucleico pueden contener dentro de una secuencia más larga o comprender únicamente las siguientes secuencias o un fragmento de las mismas:

Cebador directo: 5' GAGCTAACCGGAGAGGGAGA 3'
Cebador inverso: 5' CGCATACCGACTTTCGTC AA 3'.

15 11. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la cepa de MDV virulenta es seleccionada entre RB1 B MDV, 584A MDV, 595 MDV, 684A MDV, Md5 MDV, HPRS-B14 MDV, JM102 MDV, 660A MDV, 675A MDV, 549 MDV, 571 MDV o C12-130 MDV.

12. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la muestra de ácido nucleico proporcionada se obtiene de los siguientes tejidos: sangre, bazo, hígado, piel, ovarios, bursa, timo, riñón y puntas de pluma.

20 13. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la señal detectable comprende un agente fluorescente tal como un colorante fluorescente o un cromóforo, y es opcionalmente un colorante seleccionado entre MAR, JUP, NEP, SAT, URA.

14. Uso del procedimiento de cualquier reivindicación anterior en el diagnóstico de la infección con MDV-1 virulento en aves.

15. Uso del procedimiento de cualquier reivindicación anterior como herramienta de investigación en el desarrollo y/o ensayo de vacunas contra MDV-1.

25 16. Un kit de piezas que comprende:

- (i) cebadores que amplificarán una región del gen pp38 que porta un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre la cepa de vacuna y la cepa virulenta de MDV-1, siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b)); y
- (ii) una sonda de ácido nucleico marcada para el polimorfismo de pp38 específico de bien (1) la cepa de vacuna de MDV-1 o (2) las cepas virulentas de MDV-1.

30

17. Un kit de piezas que comprende:

- (i) cebadores que amplificarán una región del gen pp38 que porta un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) uniforme entre la cepa de vacuna y la cepa virulenta de MDV-1, siendo dicho SNP un polimorfismo G/A ubicado en la posición 320 de las secuencias de la Figura 1 ((a) y (b));
- (ii) una sonda de ácido nucleico marcada para el polimorfismo de pp38 específico de la cepa de vacuna; y
- (iii) una sonda de ácido nucleico marcada para el polimorfismo de pp38 específico de cepas virulentas de MDV-1.

35

18. El kit de las reivindicaciones 16-17, en el que el kit comprende además reactivos de qPCR convencionales.

19. El kit de las reivindicaciones 16-18, que comprende además reactivos necesarios para una qPCR convencional conocida que utiliza una sonda marcada con una señal detectable distinta.

40 20. El kit de las reivindicaciones 16-19, en el que la cepa de vacuna es la vacuna CVI988.

21. El kit de las reivindicaciones 16-20, en el que la/s sonda/s de ácido nucleico puede(n) contener dentro de una secuencia más larga o comprender únicamente las siguientes secuencias o un fragmento de las mismas:

sonda específica de la cepa de vacuna: 5' CCCACCGTGACAGCC 3'; y/o
sonda específica de la cepa virulenta: 5' CCCACTGTGACAGCC 3'.

45 22. El kit de las reivindicaciones 16-21, en el que el kit comprende además una sonda total que se une tanto a las cepas de vacuna como a las cepas virulentas.

23. El kit de la reivindicación 22, en el que la sonda total puede contener dentro de una secuencia más larga o comprender únicamente la siguiente secuencia o un fragmento de la misma:

5' GCTACCGCCTGAGCC 3'.

50

Figura 1(a)

CVI988 (cepa de vacuna)

ATGGAATTCGAAGCAGAACACGAAGGGCTGACGGCGTCTTGGGTGCGCCCCGCTCCC
 CAGGGTGGAAAAGGGGCGGAGGGCCGCGCAGGGGTGCGCCGACGAGGCAGGGCATGGG
 AAAACAGAAGCGGAATGCGCCGAGGACGGCGAGAAATGCGGGGACGCCGAGATGAGC
 GCTTTGGATCGGGTCCAGAGGGACCGGTGGAGATTAGTTCTCCGCCCCCTCACTCT
 GGAGTCACGGGGAAGGGGGCTATTCCAATAAAGGGTGATGGGAAGGCGATAGAATGC
CAGGAGCTAACCGGAGAGGGAGAGT **GGCTGTCACGGTGGG** **GGGA** **GCTACCGCCTGA**
GCCCCGGAGGTCAGGGAATGAACATCTTGACGAAAGTCGGTATGCGAAACAAACCGA
 AAGGGGTAGCTCTACGGGAAAGAAGAGGGAGATGGTATGAAGCAGATGGGGGAGCT
 TGCCAGCAGTGCGAAGGAGGAACATATGCGGACTTGCTTGTGCGAAGCAGAGCAAGC
 TGTGTACATTCCGTTGCGCATTAATGCTGGCCGAAAGACAAAACCCAAATATATT
 GGGGAGCATTTGAATAAAAAACGGGTTCTTGTACAACGACCCCGTACTATTCTATC
 CGTGGAGTCAGAGAATGCAACAATGCGTTCTTATATGCTGGTTACATTGATCTGTTC
 TGCAAATCATTATTACTAGGATCGTGATGTCATTTTTCGCTGGTATGTTAGTCGG
 TAGAACGGCAGACGTAAAAACACCATTATGGGATACTGTATGTTTGTTAATGGCTTT
 CTGTGCAGGCATTGTCGTTGGGGGAGTGGATTCTGGGGAGGTGGAATCTGGAGAAAC
 AAAATCTGAATCAAATTAA

Figura 1(b)

Md5 (cepa virulenta representativa)

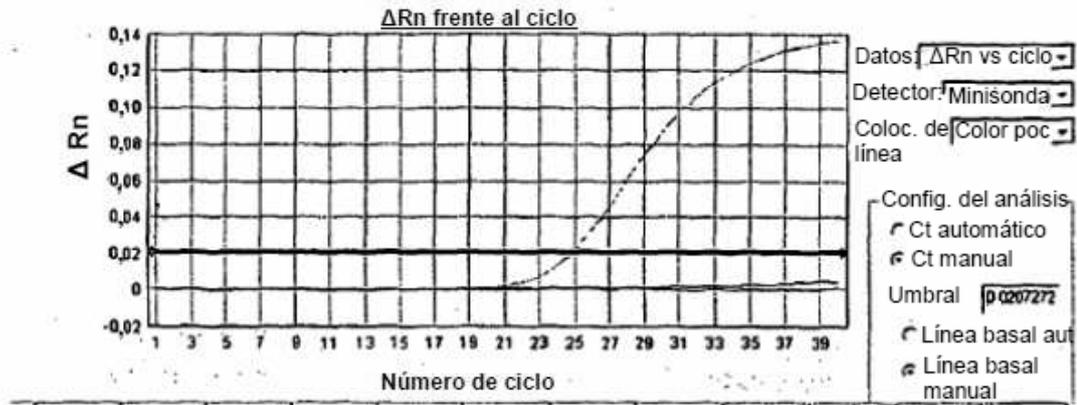
ATGGAATTCGAAGCAGAACACGAAGGGCTGACGGCGTCTTGGGTCGCCCCGCTCCC
 CAGGGTGGAAAAGGGCGGAGGGCCGCGCAGGGGTGCGCCGACGAGGCAGGGCATGGG
 AAAACAGAAGCGGAATGCGCCGAGGACGGCGAGAAATGCGGGGACGCCGAGATGAGC
 GCTTTGGATCGGGTCCAGAGGGACCGGTGGAGATTCAGTTCTCCGCCCCCTCACTCT
 GGAGTCACGGGAAGGGGGCTATTCCAATAAAGGGTGATGGGAAGGCGATAGAATGC
 CAGGAGCTAACC GGAGAGGGAGAGT **GGCTGTACAGTGGGAG** GA **GCTACCGCCTGA**
GCCCCGGAGGTCAGGGAATGAACATCTTGACGAAAGTCGGTATGCGAAACAAACCGA
 AAGGGTAGCTCTACGGGGAAAGAAGAGGGAGATGGTATGAAGCAGATGGGGGAGCT
 TGCCACAGCAGTGCGAAGGAGGAACATATGCGGACTTGCTTGTGCGAAGCAGAGCAAGC
 TGTTGTACATTCGTTTCGCGCATTAAATGCTGGCCGAAAGACAAAACCCAAATATATT
 GGGGAGCATTTGAATAAAAAACGGGTTCTTGTAACAACGACCCCGTACTATTCTATC
 CGTGGAGTCAGAGAATGCAACAATGCGTTCTTATATGCTGGTTACATTGATCTGTTC
 TGCAAAATCATTATTACTAGGATCGTGCATGTCATTTTTCGCTGGTATGTTAGTCGG
 TAGAACGGCAGACGTAAAAACACCATTATGGGATACTGTATGTTTGTTAATGGCTTT
 CTGTGCAGGCATTGTCGTTGGGGGAGTGGATTCTGGGGAGGTGGAATCTGGAGAAAC
 AAAATCTGAATCAAATTA

Figura 2

A. Sonda específica de CVI988

ADN de CVI988 (o)
ADN de RB1B (x)

La línea basal en cero es control sin molde



B. Sonda específica de MDV-1 virulento

ADN de RB1B (x)
ADN de CVI988 (o)

La línea basal en cero es control sin molde

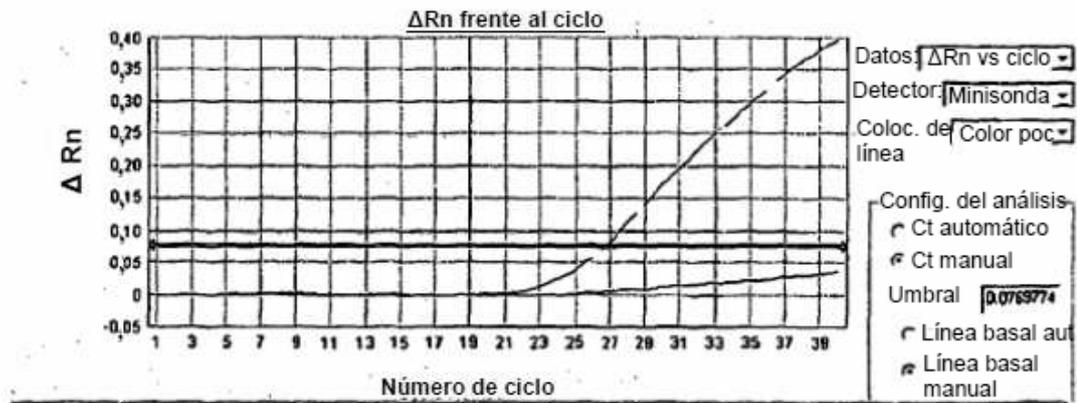


Figura 3

Figura 3 (a)

Curva patrón usando la sonda de vacuna de pp38 en patrones de ADN de CVI988

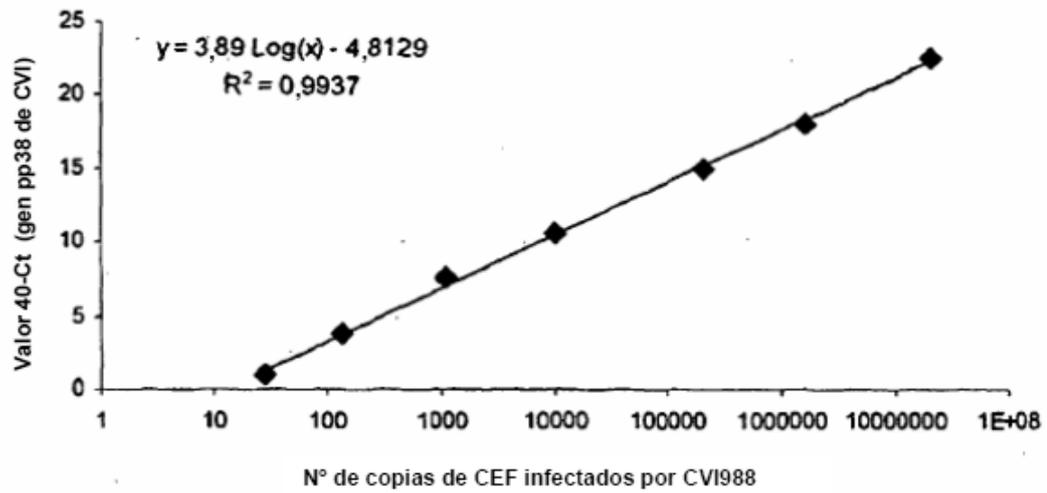


Figura 3 (b)

Curva patrón usando la sonda virulenta de pp38 en patrones de ADN de RB-1B

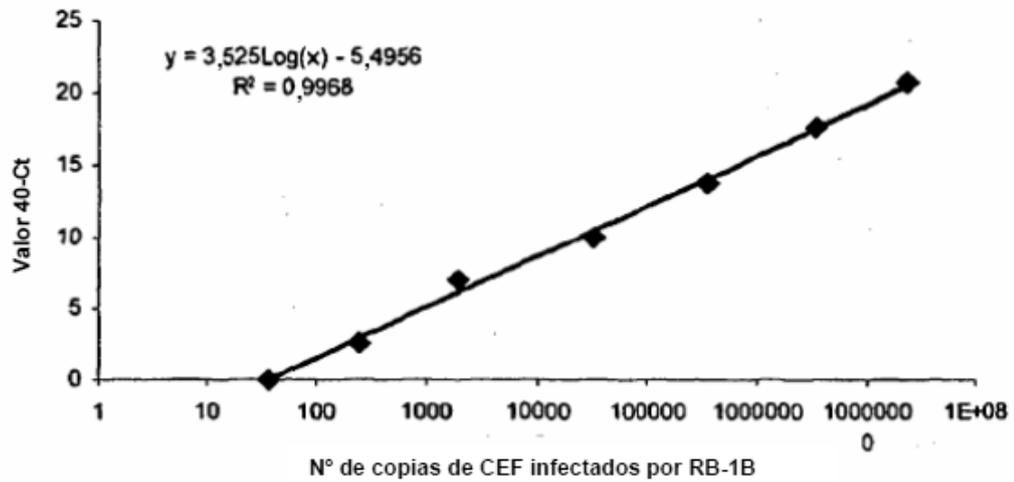


Figura 3 (c)

Curva patrón usando la sonda de de pp38 total en patrones de ADN de CVI

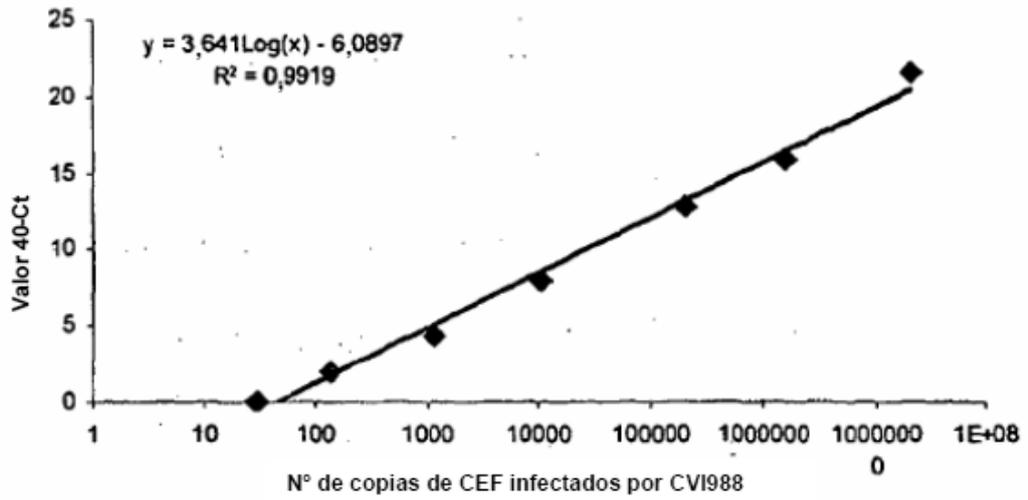


Figura 3 (d)

Curva patrón usando la sonda de de pp38 total en patrones de ADN de RB-1B

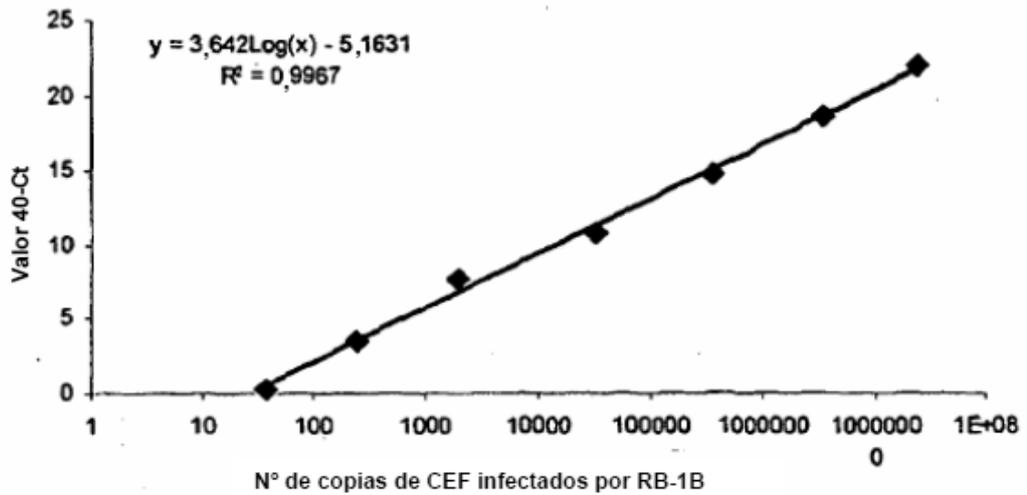


Figura 4

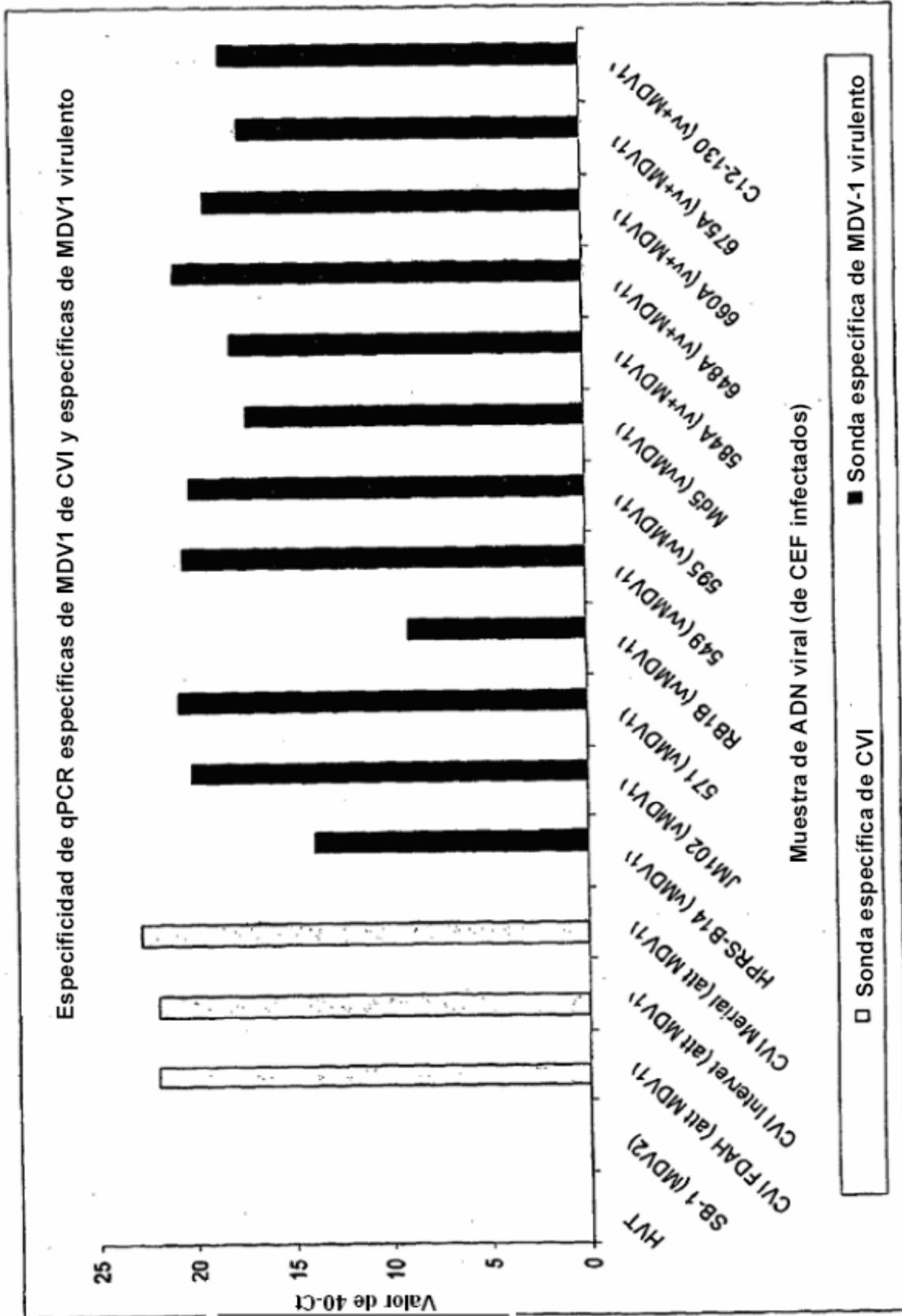


Figura 5

Curva patrón de Ovo usando patrones de ADN de CEF no infectados

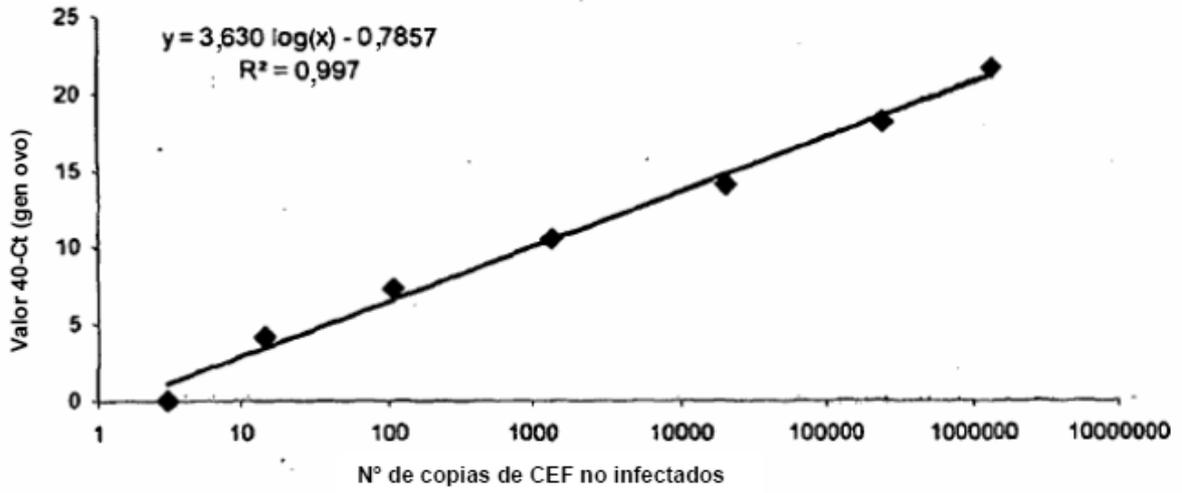


Figura 6(a)
Vacuna pCVI988

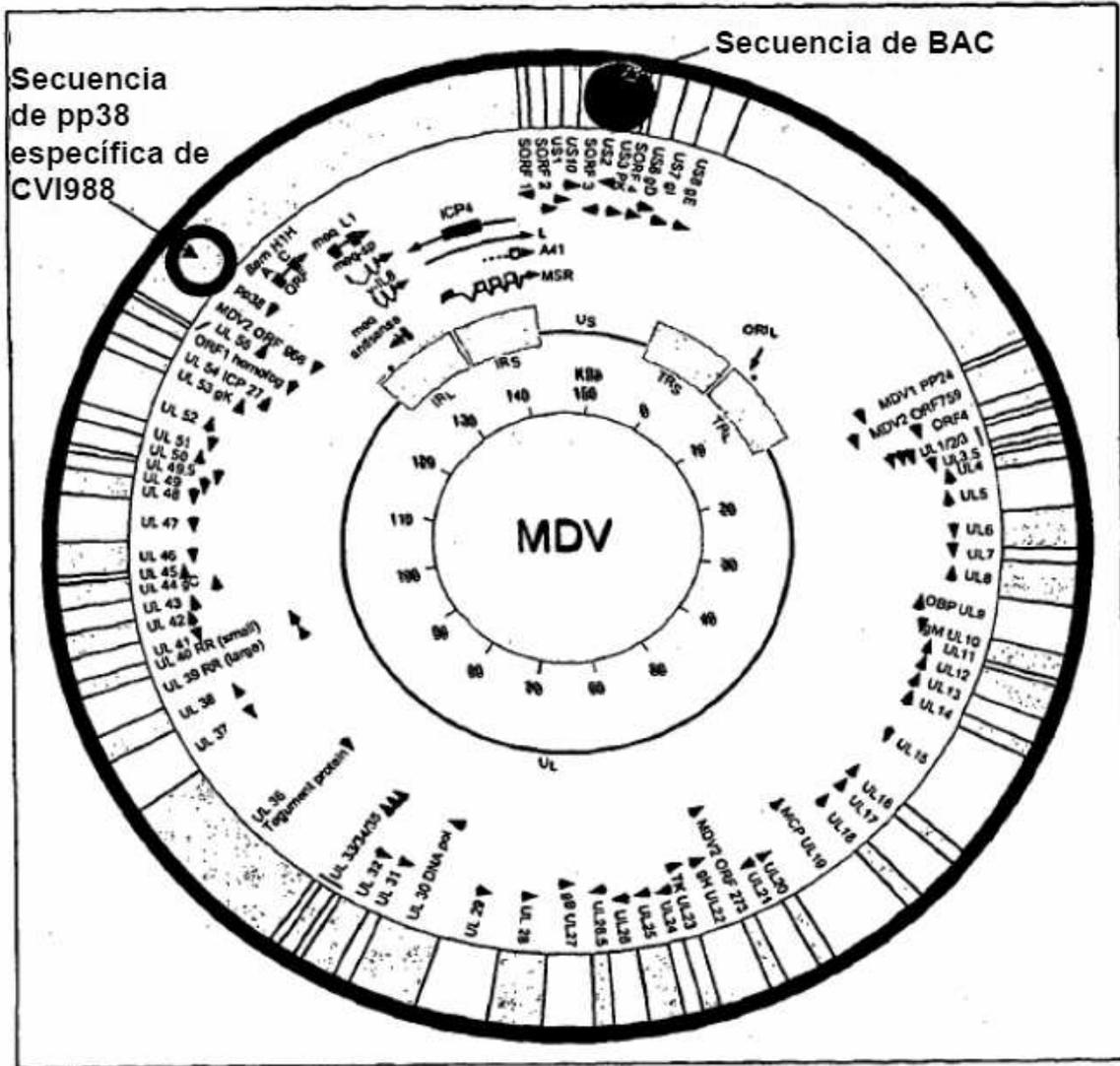


Figura 7

Figura 7 (a)

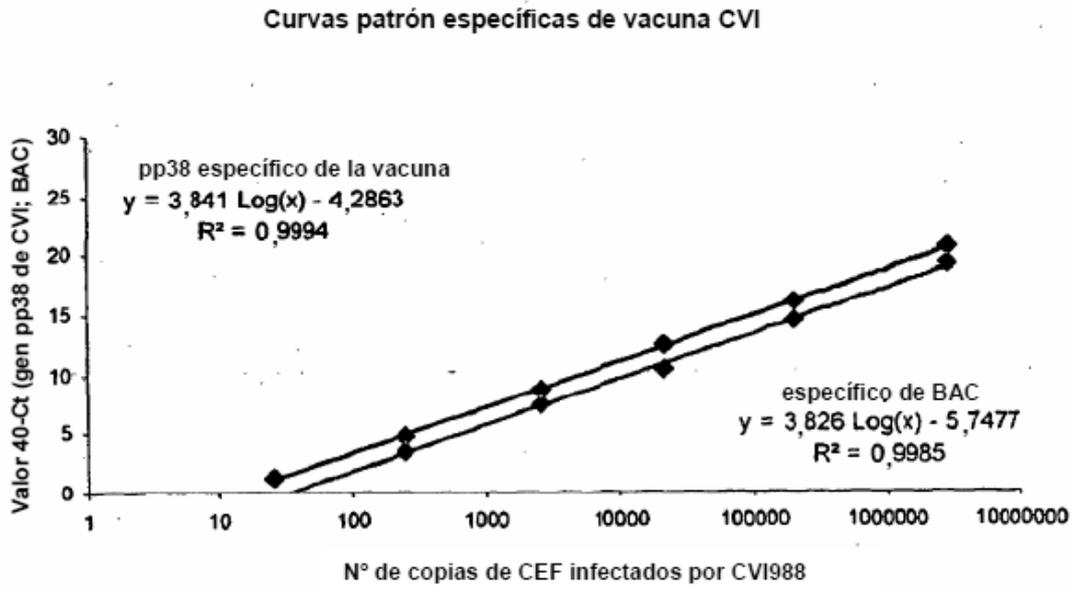


Figura 7 (b)

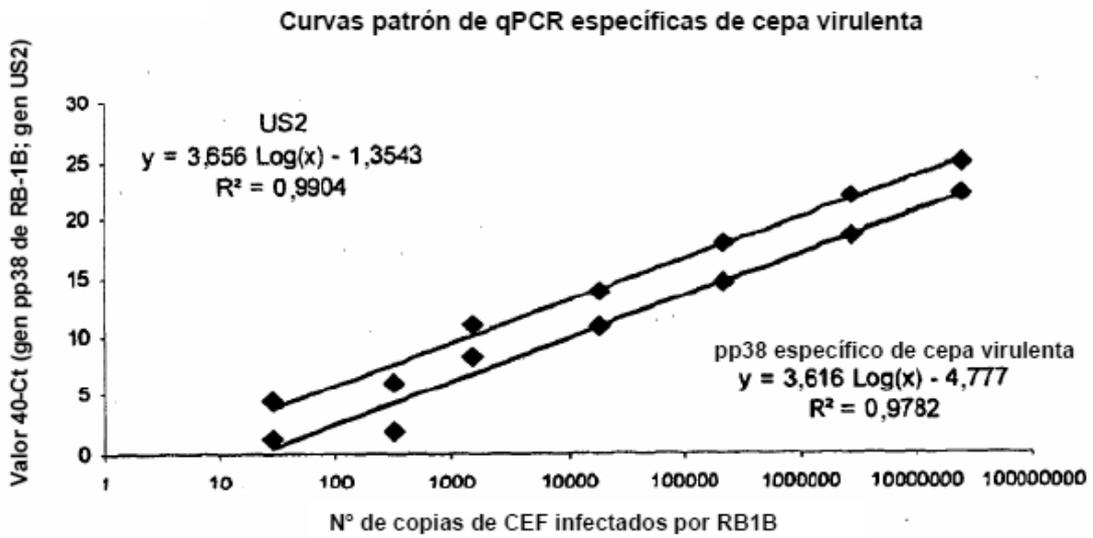


Figura 8

Nº de ave	Virus de la vacuna		Virus de desafío		Virus total			Grupo
	pp38 CVI	BAC	pp38 vir	US2	pp38 total	pp38 CVI viral total + pp38 vir	BAC +US2	
7	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	1
8	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	1
9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	1
10	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	1
20	0,6	0,6	10,4133	0,610321	6,3400262	11,013267	1,210321	1
33	12,08422	6,86523	0,6	0,6	6,217141	12,684216	7,465229	2
34	73,89111	41,9362	0,6	0,6	69,505476	74,491108	42,53621	2
35	108,9216	62,8334	0,6	0,6	135,02325	109,52162	63,43342	2
36	38,44967	20,1465	0,6	0,6	46,563351	39,049666	20,74648	2
37	27,04878	14,1326	0,6	0,6	15,608305	27,648783	14,73263	2
38	22,07838	10,8055	0,6	0,6	11,909725	22,678378	11,40551	2
39	66,8376	30,4068	0,6	0,6	40,047342	67,437598	31,00682	2
40	91,48551	42,5222	0,6	0,6	66,834552	92,085513	43,1222	2
57	46,02852	37,5797	0,6	0,6	25,292471	46,62852	38,17967	2
58	40,31057	19,7312	0,6	0,6	22,422805	40,910566	20,33119	2
59	22,5008	17,3914	0,6	0,6	23,53557	23,100805	17,99143	2
60	26,0569	15,2566	0,6	0,6	32,832402	26,656902	15,85664	2
73	53,56301	29,4951	0,6	0,6	29,989807	54,163009	30,09514	3
74	2,756061	2,31151	0,6	0,6	0,7493988	3,3560606	2,911508	3
75	111,9461	60,3714	0,6	0,6	69,592823	112,54611	60,97139	3
76	25,80373	13,5721	0,6	0,6	9,7218418	26,403734	14,17206	3
77	95,00511	43,0761	0,6	0,6	89,788494	95,605107	43,67613	3
78	34,57861	14,7835	0,6	0,6	29,559124	35,178607	15,38354	3
79	209,1736	79,0153	0,6	0,6	91,518889	209,77359	79,61528	3
80	74,00517	31,7329	0,6	0,6	30,167914	74,60517	32,33293	3
53	0,6	6,53149	186,441	105,8535	157,3787	187,04092	112,385	3
54	23,60337	13,3084	0,6	0,6	19,567058	24,203367	13,90842	3
55	0,6	0,6	520,435	292,1547	180,2854	521,03523	292,7547	3
56	0,6	8,65401	135,14	70,7959	61,833435	135,73995	79,4499	3
97	27,61513	36,576	257,743	181,7754	139,91434	285,35809	218,3515	3
98	93,3635	77,5982	17,4293	24,81795	72,023249	110,79276	102,4162	3
113	0,6	0,6	153,463	114,0614	56,894591	154,06313	114,6614	4
114	0,6	0,6	657,876	492,0194	491,5686	658,47595	492,6194	4
115	0,6	0,6	658,286	556,68	469,6545	658,88565	557,28	4
116	0,6	0,6	1695,07	1862,283	801,4807	1695,6744	1862,883	4
117	0,6	0,6	508,742	430,4008	193,58847	509,34249	431,0008	4
118	0,6	0,6	3138,3	4560,695	1440,8261	3138,9007	4561,295	4
119	0,6	0,6	970,272	784,7185	307,26794	970,87209	785,3185	4
120	0,6	0,6	2759,31	3795,307	1115,4084	2759,9081	3795,907	4
127	0,6	0,6	22066,3	64459,18	24699,696	22066,918	64459,78	4

Figura 9

Figura 9(a)

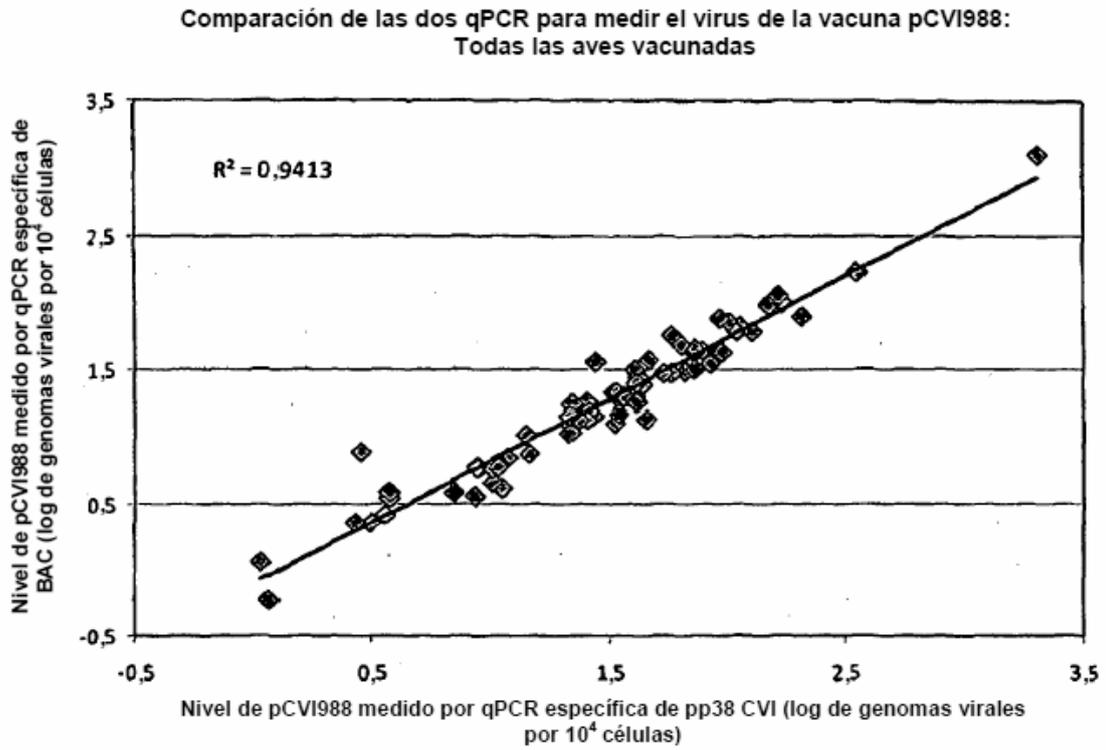


Figura 9(b)

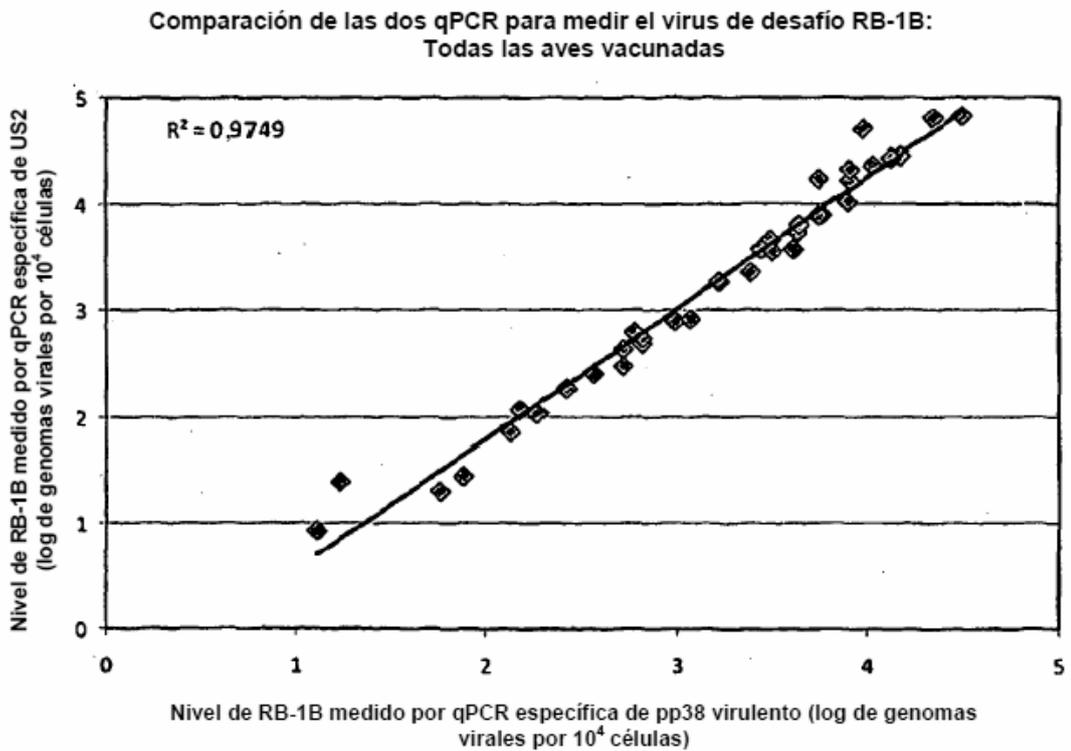


Figura 10

Figura 10(a)

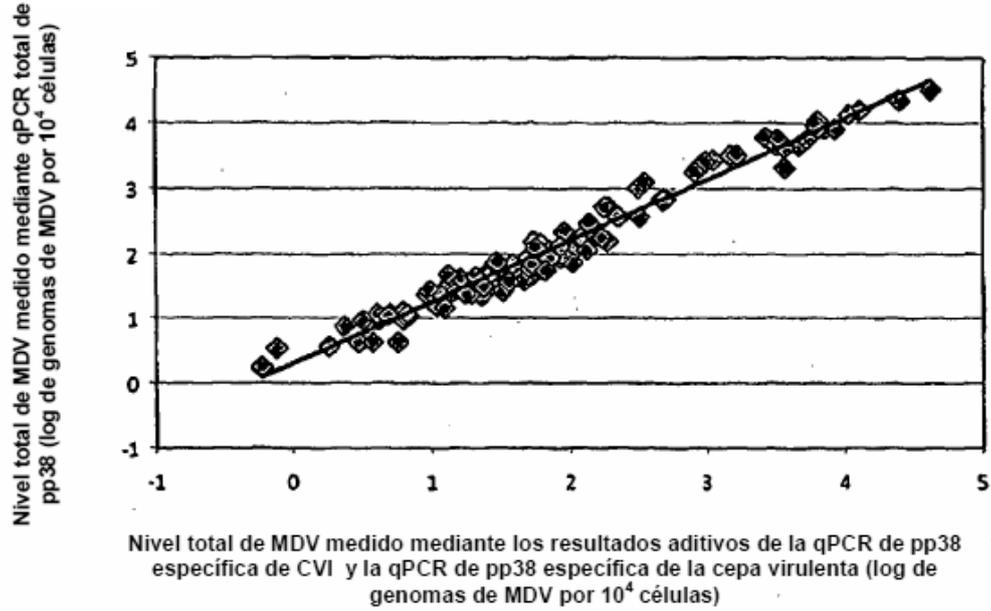


Figura 10(b)

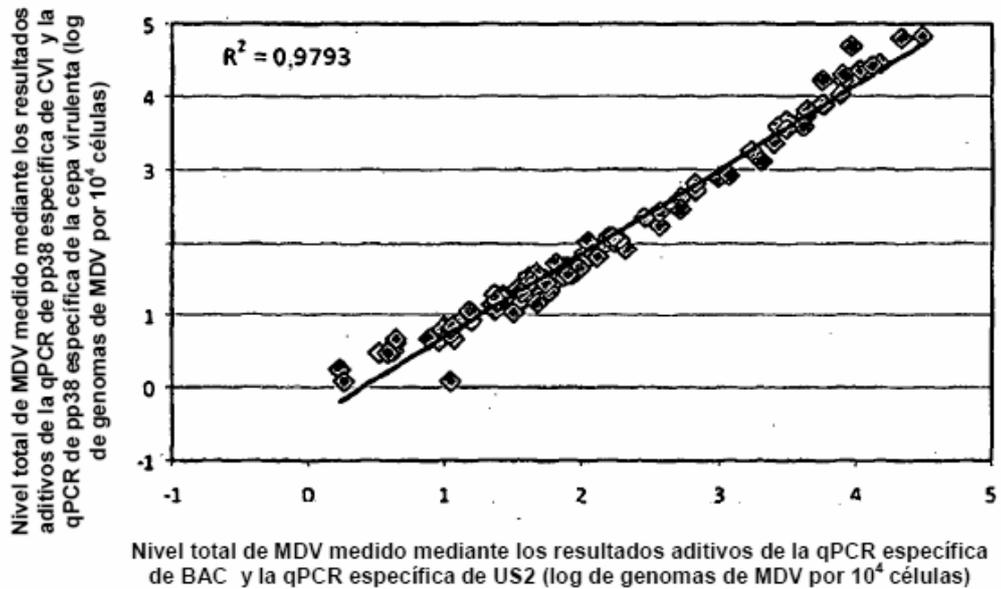


Figura 10(c)

