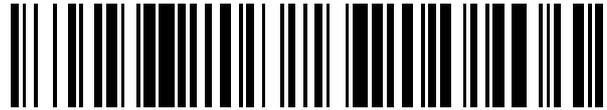


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 567 712**

51 Int. Cl.:

C07K 14/08 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2009 E 09738098 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.03.2016 EP 2271663**

54 Título: **Nuevos Astrovirus aviares**

30 Prioridad:

28.04.2008 EP 08155271

29.04.2008 US 48751

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

26.04.2016

73 Titular/es:

INTERVET INTERNATIONAL B.V. (100.0%)

P.O. Box 31 Wim De Körverstraat 35

5831 AN Boxmeer, NL

72 Inventor/es:

DE WIT, SJAAK;

SCHRIER, CARLA CHRISTINA;

VAN DE LAAR, MARCEL y

VERSTEGEN, IWAN

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 567 712 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

Nuevos Astrovirus aviares

5 La presente invención se refiere a los cambios de la virología y la inmunología veterinaria. En particular, la invención se refiere a un nuevo Astrovirus aviar; a anticuerpos o fragmentos de los mismos contra el nuevo virus; a preparaciones antigénicas, proteínas, y moléculas de ADN del nuevo Astrovirus aviar; a vacunas del nuevo virus o sus preparaciones antigénicas, proteínas, o ADN; a métodos para la fabricación de dichas vacunas, y a kits diagnósticos.

10 Los Astrovirus son virus pequeños, redondos no envueltos que tienen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. La mayoría de los astrovirus se han asociado como causantes de algunos tipos de enteritis, dando lugar a diarrea, vómitos, mala absorción, malestar general, y retraso del crecimiento. La infección puede ser letal en seres humanos o animales que sean menos resistentes, tales como jóvenes, ancianos, o individuos inmunocomprometidos. Véase: Matsui y Greenberg (en: Fields virology, 3ª ed., 1996, ed.: B. Fields et al., ISBN: 781702534, capítulo 26), y: Moser y Schultz-Cherry (2005, Viral Immunology, vol. 18, p. 4-10).

15 Asimismo, la gravedad de la patología inducida por astrovirus puede variar como resultado de las diferencias en la virulencia entre especies o cepas de Astrovirus. Esto ha creado la creencia de que algunos de los Astrovirus actúan como patógenos secundarios, que por sí mismos causan únicamente una enfermedad subclínica, mientras que los síntomas clínicos completos de enfermedad solo se manifiestan cuando hay causas adicionales de enfermedad a causa de otro patógeno.

20 El mecanismo mediante el que se logra inmunidad contra la infección por Astrovirus tampoco está completamente claro; los anticuerpos neutralizantes de virus parecen desempeñar un papel en la defensa y la memoria inmunológica, pero probablemente no son los únicos efectores de una respuesta inmunitaria contra la infección por Astrovirus. Esto se ha revisado por M. Koci (2005, Viral Immunology, vol. 18, p. 11-16).

25 Los Astrovirus se han detectado en todo el mundo y se han aislado de una gran variedad de animales. A su vez, entre las especies de Astrovirus que infectan a un determinado animal diana, se han descrito varios serotipos. Taxonómicamente, la familia *Astroviridae* se divide en dos géneros principales, los Astrovirus de mamífero: Mamastrovirus, y los Astrovirus aviares: Avastrovirus. Actualmente el género Avastrovirus comprende las especies reconocidas formalmente: Virus de la nefritis aviar 1 y 2 (ANV1, 2) (de pollo), y Astrovirus de pavo 1 y 2 (TAstV1, 2).

30 Se han aislado varios Astrovirus aviares adicionales de patos, pollos, avestruces y pavos. Por ejemplo, el astrovirus de pollo 2 (CAstV2) ha sido descrito por Baxendale y Mebatsion (2004, Avian pathology, vol. 33, p. 364-370; y en la solicitud internacional de patente WO 2004/027053), y Todd et al. describieron un CAstV3 (documento WO 2007/077464), que está estrechamente relacionado con CAstV2. Estos Astrovirus no se han clasificado aun formalmente, tal como se revisa por Koci y Schulz-Cherry (2002, Avian Pathology vol. 31, p. 213-227).

35 Los Astrovirus son muy estables en el ambiente, por ejemplo, pueden resistir a los disolventes de lípidos y detergentes comunes, tienen una amplia tolerancia de pH, y son comparativamente termoestables. Esto, combinado con su alta infectividad y fácil transmisión por la ruta fecal-oral, explica por qué los Astrovirus o anticuerpos contra estos pueden encontrarse en muchos seres humanos y animales en todo el mundo.

40 La clasificación y denominación de estos pequeños virus de ARN se ha sometido a cambios frecuentes, cuando se necesitó su actualización para acomodar nuevos datos experimentales. Por ejemplo: el Astrovirus del pato (DAstV) se clasificó anteriormente como Picornavirus, y originalmente se denominó virus de la hepatitis del pato de tipo II, ya que provoca hepatitis. De manera similar, ANV1 se describió anteriormente como un Picornavirus, en particular un Enterovirus, pero se reclasificó entre los Avastrovirus (Imada et al., 2000, J. of Virology, vol. 74, p. 8487-8493). ANV1 también se denomina: Astrovirus de pollo 1 (CAstV1), y provoca nefritis.

45 La reclasificación de estos virus se solicitó tras la disponibilidad de nueva información de la secuencia y organización de su genoma viral. En particular para los Astroviridae, se demostró que las caracterizaciones físicas, de microscopía electrónica y bioquímicas a menudo no son suficientes para diferenciar los Astroviridae de los otros conocidos como "virus redondos pequeños", o "virus similares a enterovirus", tales como Picorna-, Calici-, o Hepeviridae (virus similares a la hepatitis E), o incluso de virus de ARN envueltos, tales como Reo-, Rota-, o Coronaviridae, que provocan síntomas de enfermedad que se asemejan en gran medida a los de los Astrovirus. Esto se debe a que los resultados de dichas caracterizaciones varían dependiendo del método y de las condiciones empleadas. Por lo tanto, estos no son lo suficientemente consistentes para hacer la determinación correcta.

50 Por otra parte, la caracterización biológica molecular, tal como genotipado, en combinación con la caracterización inmunológica es lo suficientemente detallada y reproducible para asignar a un microorganismo al grupo taxonómico adecuado (Van Regenmortel et al., 2000, en: Virus Taxonomy, 7th report of the ICTV, Academic Press, Nueva York). Por lo tanto, dichas determinaciones están basadas, idealmente, en la secuenciación de nucleótidos, ensayos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y ensayos de tipado serológico.

El genoma de ARN de los Astroviridae es de aproximadamente 7 kb de tamaño, con una organización del genoma que es típica para esta familia de virus, véase: Jiang et al. (1993, PNAS-USA, vol. 90, p. 10539-10543) y Koci et al. (2000, J. of Virology, vol. 74, p. 6173-6177). De acuerdo con el conocimiento actual, el genoma incorpora tres fases de lectura abiertas (ORF) claramente reconocibles, de 5' a 3':

5 ORF 1a: es de aproximadamente 3 kb de tamaño, codifica una proteína no estructural que tiene un motivo de serina proteasa.

10 ORF 1b: es de aproximadamente 1,5 kb de tamaño, se solapa parcialmente con el ORF 1a, y codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN no estructural.

15 ORF 2: codifica las proteínas virales estructurales, a través de un ARN subgenómico de aproximadamente 2 kb. La poliproteína expresada se escinde probablemente en partes más pequeñas antes del ensamblaje viral, y comprende a.o. la proteína de la cápsida o la envoltura.

De las tres ORF, la ORF 1b tiene la secuencia de nucleótidos más conservada comparada entre las secuencias de nucleótidos de los Astrovirus que están disponibles públicamente, y la ORF 3 es la ORF más variable en secuencia.

20 Se han observado algunos problemas de enfermedades entre 1987 y la actualidad, en las operaciones con aves de corral en los Países Bajos, Alemania y los Emiratos Árabes Unidos, con pollos y pavos padeciendo diarrea, reducción en la conversión de alimentos y el crecimiento, así como problemas con la hinchazón y dolor de las articulaciones y tendones de las patas. Estos problemas se hallaron en aves de engorde, reproductoras y de mayor tamaño, de diversas edades, y en diferentes granjas que no tenían aparentemente una conexión mutua.

25 Se observó cojera en los pájaros en su primera semana de edad, hasta varios meses de edad. Los animales presentaron corvejones (tobillos) y tendones inflamados de las patas, tanto rellenos con un líquido transparente ligeramente viscoso, como con síntomas de artritis. En estas aves se observó una reducción de la utilización del alimento y del crecimiento, lo más probablemente como consecuencia de problemas locomotores. En los peores casos, las aves ya no fueron capaces de moverse y por lo tanto de obtener alimento o bebida, dando como resultado mortalidad. Estas anomalías en las patas fueron más prominentes en las aves de engorde más pesadas, aunque el daño económico sostenido fue considerable en todos los tipos de aves.

35 La diarrea tuvo un impacto aún mayor que se observó, principalmente, en aves jóvenes, pero también en aves en edad de puesta de huevos. Los síntomas variaron desde indigestión hasta enteritis evidente, y dieron como resultado la reducción de la conversión de alimento; la reducción del crecimiento o incluso pérdida de peso; reducción en la producción de huevos ("puesta"); aumento en el número de huevos de baja calidad; y mortalidad.

40 En algunas granjas estos problemas se observaron durante varios años, dando como resultado datos sostenidos de mala producción sin una causa definida.

Tras las investigaciones *post mortem*, se observó en varios casos que estaban afectadas partes del cuerpo distintas de los intestinos o las articulaciones de las patas, tal como se mostró por la erosión de la molleja o la inflamación del hígado.

45 Para detectar la causa de estos síntomas, se investigaron aspectos de la cría y la dieta pero estos no pudieron relacionarse con los problemas observados en estos casos. También se investigaron patógenos que podrían ser responsables, en particular una infección por Reovirus, ya que se sabe que este virus causa mala absorción y problemas en las articulaciones. Sin embargo, a pesar del uso de diversos ensayos, en muchos casos no pudieron detectarse Reovirus.

50 También se investigaron otros diversos patógenos bien rutinariamente o específicamente al ser conocidos por causar problemas similares, tales como bacterias: *Salmonella*, *Mycoplasma*, *Haemophilus*, y *Pasteurella*; y los virus: Adenovirus, virus de la bronquitis infecciosa (IBV), virus de la enfermedad de Newcastle (NDV), virus de la enfermedad bursal infecciosa (IBDV), síndrome de la puesta de huevos (EDS), y virus de la gripe aviar (AIV).

55 Hasta la actualidad, no pudo relacionarse un agente causal con los problemas en las patas e intestinales observados, a pesar de la gravedad, los problemas para el bienestar de los animales, y el consecuente mal rendimiento económico de estas operaciones con aves de corral.

60 Por consiguiente, existe una necesidad para identificar un agente relacionado con los síntomas de enfermedad observados y proporcionar vacunas y agentes diagnósticos, que proporcionen la prevención de la enfermedad y la identificación del agente causante.

65 Sorprendentemente, se ha descubierto un nuevo virus en pollos y pavos que padecen de enfermedad intestinal y locomotora. El virus pudo aislarse de aves enfermas de diversas edades, tipos y orígenes, tanto de las articulaciones y tendones así como de varios órganos internos. El virus aislado, a su vez, indujo síntomas de enfermedad similares

tras la infección de animales de ensayo sanos, y se pudo volver a aislar de los animales de ensayo enfermos, cumpliendo de este modo con los postulados de Koch.

5 El nuevo virus puede usarse para desarrollar ensayos diagnósticos y vacunas para detectar y combatir el virus y los problemas de salud que provoca en las aves de corral, en particular enfermedades de las articulaciones y tendones, así como del tracto gastrointestinal.

10 El nuevo virus se analizó de diversas formas, y se identificó sorprendentemente como un Astrovirus. Debido a su prevalencia en pollos y pavos se calificó a modo de tentativa como un Astrovirus aviar.

15 Entre muchas otras caracterizaciones, el hecho de que el nuevo virus, tal como se describe en el presente documento, no esté envuelto se deduce de los resultados de dos extracciones consecutivas con cloroformo, tras las cuales la muestra de virus extraída todavía era capaz de provocar un efecto patogénico específico en huevos SPF de pollo embrionados.

20 La presencia de un genoma de ARN en el nuevo virus se dedujo del hecho de que el ácido nucleico usable para el análisis posterior solo pudo obtenerse extracción de ARN y RT-PCR, no tras el aislamiento de ADN y PCR convencional.

25 Sorprendentemente, se observó que los parientes más próximos (aunque distinguibles) eran los virus de tipo ANV1, por lo tanto, los nuevos Astrovirus aviares descritos en el presente documento representan un nuevo grupo de virus de la nefritis aviar, clasificados de manera tentativa como virus ANV3.

30 Sin embargo, los inventores han descubierto sorprendentemente una serie de características que distingue a los nuevos Astrovirus aviares descritos en el presente documento de ANV y otros (Astro-) virus, y caracteriza de manera única a los distintos aislados del nuevo Astrovirus aviar como pertenecientes a un grupo nuevo e independiente por sí mismo.

35 El principal rasgo de caracterización se refiere a la presencia de una secuencia de nucleótidos específica que es identificable por un análisis de secuencia de nucleótidos y mediante ensayo PCR.

40 También se observaron síntomas patológicos distintos tras la infección de embriones. Las diferencias inmunológicas específicas fueron detectables mediante serotipado usando ensayos VN o IFT. Todos estos se describirán más adelante con resultados y detalles experimentales.

45 La invención se refiere a un nuevo Astrovirus aviar aislado que tiene una región genómica de fase abierta de lectura (ORF) 1a, caracterizada por que la ORF 1a de dicho Astrovirus aviar, cuando se compara con la ORF 1a del virus de la nefritis aviar 1, contiene una inserción de 12 nucleótidos, estando localizada dicha inserción entre los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos numerados del 2485 al 2486 de la SEQ ID NO: 1.

50 Los organismos "aviares" preferidos son aves de corral; los organismos aviares más preferidos se seleccionan entre el grupo que consiste en pollos, pavos, patos y ocas. Los más preferidos son pollos.

55 El término "Astrovirus" indica la relación del grupo de nuevos virus de acuerdo con la invención con virus que actualmente se describen y/o caracterizan como pertenecientes a la familia taxonómica de los Astroviridae. Sin embargo, el experto en la materia será consciente de que dicha clasificación taxonómica puede cambiar con el tiempo ya que nuevas revelaciones podrían dar lugar a la reclasificación en grupos taxonómicos nuevos o distintos. Sin embargo, ya que esto no altera las características del virus de acuerdo con la invención, sino solo su clasificación, dichos organismos reclasificados permanecen dentro del alcance de la invención.

60 En particular, la invención abarca todos los virus subclasificados a partir del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención en una subespecie, cepa, aislado, genotipo, serotipo, variante o subtipo y similares.

65 Por lo tanto, para la invención, un "Astrovirus" es un virus que tiene los rasgos característicos de un virus clasificado como Astrovirus. Dichos rasgos característicos se relacionan, por ejemplo, con rasgos moleculares, bioquímicos, y biológicos; por ejemplo, con tener un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo que comprende ORF identificables como 1a, 1b y 2; siendo un virión no envuelto de aproximadamente 28-30 nm; y que provocan una enteritis.

Se entiende que la expresión "región genómica" indica una parte del material genético del nuevo Astrovirus aviar de acuerdo con la invención. Dicha región consistirá en ácido nucleico; en el caso del nuevo Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, el ácido nucleico es ARN.

El genoma del nuevo Astrovirus aviar de acuerdo con la invención comprende, al igual que todos los demás *Astroviridae*, regiones reconocibles y correspondientes a las ORF 1a, 1b y 2.

Sin embargo, sorprendentemente se descubrió que el nuevo Astrovirus aviar tiene algunos nucleótidos en su región genómica de ORF 1a que no están presentes en la ORF 1a de ANV1 o de cualquier otro tipo de Astrovirus (aviar). Estos nucleótidos están presentes en forma de una secuencia lineal y continua de 12 nucleótidos, y cuando se comparan con la secuencia de ORF 1a de ANV1 representa una inserción en esta región. La "inserción" de 12 nucleótidos estaba presente en la ORF 1a de todos los aislados ensayados del grupo de nuevos Astrovirus aviares descritos en el presente documento.

La localización en donde está presente la inserción de 12 nucleótidos en la ORF 1a de los aislados de los nuevos Astrovirus aviares descritos en el presente documento, está indicada por referencia a la numeración tal como se describe para la secuencia genómica de la cepa de referencia de ANV1, que se describió por Imada et al. (2000, J. of Virology, vol. 74, p. 8487-8493). La secuencia de ADNc de la secuencia genómica de esta cepa de ANV1 también está disponible a través de la base de datos de nucleótidos de Internet de los American National Institutes of Health, conocida como GenBank, con el número de referencia: AB033998, y está representada en el presente documento como SEQ ID NO: 1.

Para todos los aislados de los nuevos Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, la inserción de 12 nucleótidos en la ORF 1a se localizó entre los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos numerados del 2485 al 2486 de la SEQ ID NO: 1.

Actualmente no se sabe si, o cómo, esta inserción de 12 nucleótidos en la ORF 1a del nuevo Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, que no está presente en la ORF 1a de ANV1, tiene influencia en el comportamiento de este nuevo Astrovirus aviar. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, los inventores asumen que el hecho de que exista la inserción de 12 nucleótidos, por lo tanto de 4 tripletes que mantienen el marco de traducción de la ORF 1a intacto, hace que los 4 aminoácidos adicionales codificados se incorporen en las proteínas no estructurales que se expresan a partir de la ORF 1a. Es muy posible que esto influya el comportamiento patobiológico de los virus, por ejemplo, su virulencia y su capacidad para provocar enfermedades del intestino así como de las patas, articulaciones y tendones.

Sin embargo, el hecho de que estos 12 nucleótidos estén presentes en la región genómica ORF 1a de los nuevos Astrovirus aviares descritos en el presente documento, pero no en la ORF 1a de ANV1 u otros Astrovirus (aviares), proporciona un marcador genético positivo para este nuevo grupo de virus.

Tal como se conoce bien en la técnica, un marcador genético es una característica del material genético de un organismo, situado en una determinada localización genómica, que es útil para hacer una determinada distinción o correlación, y es detectable por medios químicos. Cuando, como es el caso, una característica está presente en un grupo que se va a identificar, es un marcador genético "positivo" para ese grupo.

La secuencia de nucleótidos de la inserción de 12 nucleótidos que caracteriza al nuevo Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, no es idéntica para todos los aislados del nuevo Astrovirus aviar descrito en el presente documento, aunque el tamaño y la localización fueron idénticos. El consenso de la secuencia de nucleótidos de la inserción de 12 nucleótidos es:

5'- TCYGGDMARYYT -3', representada en el presente documento como SEQ ID NO: 2.

Por lo tanto, en una realización preferida, la invención se caracteriza por que la inserción de 12 nucleótidos tiene una secuencia de ácido nucleico como la presentada en la SEQ ID NO: 2.

El experto en la materia sabrá que la secuencia de la SEQ ID NO: 2 es una secuencia cebadora denominada "desnaturalizada", que indica que hay posiciones (en este caso: Y, D, M, y R), en donde puede estar presente uno de una serie de nucleótidos. El código usado comúnmente para indicar las bases desnaturalizadas es el código IUPAC (publicado en Biochem. J., 1985, vol. 229, p. 281-286), en el que: R = G o A; Y = T o C; M = A o C; K = G o T; S = G o C; W = A o T; H = A, C, o T; B = G, T, o C; V = G, C, o A; D = G, A, o T; y N = G, A, T, o C.

Para el nuevo Astrovirus aviar descrito en el presente documento, la presencia de este marcador genético detectable permite la identificación del nuevo virus y su nuevo grupo mediante la detección por ejemplo, mediante secuenciación de ADN o PCR.

La secuenciación de ADN es una técnica bien conocida; están ampliamente disponibles protocolos y equipos convencionales, por ejemplo, para secuenciación automatizada de alta velocidad. Más comúnmente, dichos protocolos emplean "secuenciación cíclica" basada en la PCR, seguidos de electroforesis de alta definición.

Para la secuenciación del ácido nucleico de virus de ARN, tales como Astroviridae, el ácido nucleico que se va a investigar tiene que estar en la forma de ADN copia (ADNc), ya que la secuenciación de ARN aún no es factible. Para la preparación de ADNc hay disponibles muchos protocolos convencionales y kits comerciales. Dichos protocolos emplean una enzima transcriptasa inversa. Comúnmente, se usa un cebador para iniciar el proceso de copiado.

Un ejemplo de un cebador adecuado para la reacción RT es el oligonucleótido de ADN presentado en el presente documento como SEQ ID NO: 3, siendo: 5'- TCG WTS CTA CYC -3'. Los inventores se refieren a este cebador como cebador 17.

5 Este cebador hibrida con la región 3' distante del genoma de muchos Astrovirus aviáres, comenzando en el nucleótido correspondiente al número de nucleótido 6731 de la SEQ ID NO: 1, y avanzando en dirección inversa.

10 En la figura 1 se muestra un alineamiento múltiple de la secuencia de ADNc de una sección de la ORF 1a de un número seleccionado de aislados de los Astrovirus aviáres de acuerdo con la invención. Estos se alinean con la parte correspondiente del genoma de un virus de referencia ANV1, según se representa en la SEQ ID NO: 1. Tal como es claramente visible en el área recuadrada, todos los aislados poseen una región de 12 nucleótidos, que no está presente en la ORF 1a de ANV1. Las SEQ ID NO de la secuencia de ADNc de la ORF 1a de los aislados del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención se listan en la tabla 1.

15 De manera similar, la figura 2 muestra un alineamiento múltiple de las supuestas secuencias de aminoácidos, tal como se preparan mediante traducción informatizada de las secuencias de ADNc listadas en la figura 1. Tal como es visible en el área recuadrada, la proteína codificada por la ORF 1a de los Astrovirus aviáres de acuerdo con la invención contiene 4 aminoácidos que no están presentes en la proteína codificada por la ORF 1a de ANV1. Las SEQ ID NO de la secuencia de ORF 1a traducida de los aislados de los Astrovirus aviáres de acuerdo con la
20 invención se listan en la tabla 1.

25 Con respecto a los aislados de los Astrovirus aviáres de acuerdo con la invención: se recogió un gran número de aislados de campo a lo largo del tiempo de pollos y pavos que padecían enfermedad en las patas y/o intestinos tal como se ha descrito anteriormente. Muchos de estos aislados se analizaron, lo que condujo a la invención del nuevo grupo de Astrovirus aviáres, tal como se describe en el presente documento. Sin embargo, en el presente documento solo se presenta una selección de todos los aislados analizados, para definir el nuevo Astrovirus aviar en el contexto de la variación natural que sucede en ese grupo.

30 La tabla 1 presenta una descripción de los Astrovirus aviáres de acuerdo con la invención, que se describen en el presente documento. Asimismo, la tabla 1 lista las SEQ ID NO de las secuencias de ADNc y de proteína putativas de las ORF 1a, 1b y 2 de una selección de aislados.

Tabla 1: Características de una selección de aislados del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención; también las SEQ ID NO de las regiones de ADNc secuenciadas ("nt") y las proteínas putativas codificadas ("aa").

Número de aislado	Animal donante:				SEQ ID NO		
	especie	tipo	edad	tejido	Orf 1a	Orf 1b	Orf 2
161319 "Aislado 19"	Pollo	capa	36 s	Tráquea	nt: 4 aa: 5	nt: 6 aa: 7	nt: 8 aa: 9
637	Pollo	engorde	12 d	Tendón y cartílago del corvejón	nt: 10 aa: 11		
686	Pollo	engorde	10 d	Varios órganos	nt: 12 aa: 13		
714	Pollo	engorde	30 d	Amígdalas cecales	nt: 14 aa: 15		
715	Pollo	engorde	30 d	Amígdalas cecales	nt: 16 aa: 17		
1736	Pollo	engorde	--	Tendón y tibia	nt: 18 aa: 19		
2383	Pavo	engorde	--	Articulación y fluido sinovial	nt: 20 aa: 21		
2388	Pavo	engorde	--	Tendón y tibia	nt: 22 aa: 23		
7279	Pollo	---	--	Páncreas	nt: 24 aa: 25		
161317	Pollo	capa	36 s	Tráquea	nt: 26 aa: 27		
"nt" = secuencia de nucleótidos; "aa" = secuencia de aminoácidos; "--" = desconocido							

Puede obtenerse un aislado de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención de aves que padecen problemas intestinales o en las patas tomando una muestra de uno o más órganos, o de las articulaciones o tendones de las patas. Las muestras pueden homogenizarse cuando sea necesario, y por ejemplo mezclarse con una solución tampón adecuada, preferentemente que contenga antibióticos.

5 Para amplificar el título viral de dichos aislados, pueden usarse diferentes sustratos, tales como líneas celulares aviares o huevos de aves embrionados. Cuando se usan huevos, la suspensión puede inocularse en su interior y cultivarse en huevos de aves embrionados. Son posibles diferentes rutas de inoculación, tales como la membrana corio-alantoica (CAM), o dentro del saco vitelino, o la cavidad del fluido alantoico. Preferentemente, las primeras
10 rondas de inoculación son en el interior del saco vitelino, y las posteriores (en caso necesario) pueden ser en el fluido alantoico. Pueden usarse huevos SPF de pollo embrionados de 5-7 días de edad. Dichas técnicas se conocen bien por los expertos en la materia, y hay disponibles comercialmente huevos SPF de pollo de la calidad y edad adecuada, por ejemplo, de Spafas® o Lohmann®.

15 Después de incubación durante 2 - 7 días en condiciones adecuadas, pueden recogerse el embrión, la CAM, o (preferentemente) el fluido alantoico. En caso necesario, pueden efectuarse rondas adicionales de amplificación en huevos, mediante inoculación en el saco vitelino o el fluido alantoico. Finalmente, puede recogerse fluido alantoico que contiene altas cantidades del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención.

20 Para la secuenciación por PCR de ambas hebras de una parte representativa de la ORF 1a pueden usarse convenientemente los siguientes cebadores:

SEQ ID NO: 28: 5'- AAA GGK AAG ACD AAG ARR RAC MG -3', y

25 SEQ ID NO: 29: 5'- TCG CCT TCT GGA AGG TCT TCA -3'.

Los inventores hacen referencia a estos cebadores de secuenciación como cebadores F-II y R-II-3, respectivamente. La SEQ ID NO: 28 hibrida comenzando en los nucleótidos correspondientes al nt 2171 y posteriores de ANV1 (SEQ ID NO: 1); La SEQ ID NO: 29 hibrida con nucleótidos que comienzan en el nt 2640 de la SEQ ID NO: 1, y avanza en
30 dirección inversa (véase la tabla 4). De este modo, la región genómica de la ORF 1a del astrovirus aviar de acuerdo con la invención que comprende los 12 nucleótidos no presentes en ANV, está abarcada por parte de la ORF 1a que se secuencia.

35 Para los análisis informáticos de las secuencias de ADN determinadas, estas se cortan de tal forma que no contienen las secuencias desnaturalizadas de los cebadores en sí. Asimismo, las secuencias comparadas necesitan ser de igual longitud para lograr alineamientos representativos. Asimismo, los alineamientos han de producirse sobre la longitud completa de las secuencias recortadas.

40 Esto significa, por ejemplo, en el caso de usar los cebadores de SEQ ID NO: 28 y 29, que la longitud de la secuencia que se va a comparar es de aproximadamente 400-425 nucleótidos.

45 Un programa informático para dichas manipulaciones y alineamientos es Clone Manager™ (de: Scientific and Educational software™), como alternativa, hay programas disponibles a través de internet: "ClustalW" para alineamientos múltiples, y "Translate" para traducciones, ambos accesibles a través de www.expasy.org; o los programas "Blast" en www.ncbi.nlm.nih.gov. Preferentemente, se usan los parámetros de puntuación por defecto.

50 La secuenciación de ADNc usando los cebadores de SEQ ID NO: 28 y 29 se llevó a cabo para muchos aislados de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención. Una selección de las secuencias de nucleótidos recortadas resultantes se presentan en el presente documento como las SEQ ID NO: 4, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 26, tal como se representan en la tabla 1.

55 Estas secuencias se alinean entre sí, usando como referencia la secuencia de un aislado de pollo, numerado como 161319, al que los inventores se refieren como "aislado 19". Asimismo, se alinearon varias secuencias de ADN de las partes correspondientes de ORF 1a de otros Astrovirus disponibles en GenBank, por ejemplo, ANV1 (AB033998, SEQ ID NO: 1), Astrovirus de pavo 1 (TAsTV1) (Y15936), Astrovirus de pavo 2 (AF206663), Astrovirus de oveja 2 (Y15937), Astrovirus de visón 2 (AY179509), y Astrovirus humano (Z25771); entre paréntesis se encuentran los números de referencia de GenBank respectivos.

60 De estas otras secuencias de ORF 1a de Astrovirus, solo ANV1, en particular la parte de nt 2213 - 2607 de la SEQ ID NO: 1, tuvo una identidad de secuencia que fue significativa, lo que significa un porcentaje de identidad de nucleótidos muy por encima del 50 %. De los demás Astrovirus restantes, solo TAsTV1 (n.º de ref. de GenBank: Y15936) tuvo una identidad de secuencia detectable, pero poco significativa en la parte de nucleótidos n.º 2450 - 2856. Esto se representa en la tabla 2.

65

Tabla 2: Lista de porcentajes de identidad de secuencia de nucleótidos entre la SEQ ID NO: 4 (que forma parte de la ORF 1a del aislado 19), y la secuencia de la parte correspondiente de la ORF 1a de otros aislados de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, así como de otros Astrovirus.

Aislado/nombre del virus	% de identidad de secuencia de nucleótidos con SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO, o n.º de referencia de GenBank
637	90	SEQ ID NO: 10
686	88	SEQ ID NO: 12
714	89	SEQ ID NO: 14
715	98	SEQ ID NO: 16
1736	89	SEQ ID NO: 18
2383	88	SEQ ID NO: 20
2388	88	SEQ ID NO: 22
7279	89	SEQ ID NO: 24
161317	89	SEQ ID NO: 26
ANV1	80	SEQ ID NO: 1 (parte: 2213-2607) GenBank: AB033998
TAstV1	56	GenBank: Y15936 (parte: 2450 - 2856)
TAstV2	< 50	GenBank: AF206663 (parte: no detectable)

5 En la figura 3 se presenta un árbol dendrográfico de los resultados de estos alineamientos de secuencias de nucleótidos.

10 Por lo tanto, se descubrió sorprendentemente que el grupo de nuevos Astrovirus aviares de acuerdo con la invención se apartan de todos los demás Astrovirus, aviares o de mamífero, en que comparten una identidad de secuencia de nucleótidos del 88 % o más cuando se compara una región de secuencias de ADN de ORF 1a correspondientes a la SEQ ID NO: 4.

15 Por lo tanto, en una realización preferida, la invención se refiere al Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, caracterizado por que la ORF 1a de dicho Astrovirus aviar comprende una región que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 88 % con la SEQ ID NO: 4.

20 Más preferentemente, la invención se refiere a un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, caracterizado por que la ORF 1a de dicho Astrovirus aviar comprende una región que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 89 % con la SEQ ID NO: 4, aún más preferentemente un 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % de identidad, en ese orden de preferencia.

25 A continuación de la SEQ ID NO: 4, cualquiera de las secuencias de nucleótidos parciales de ORF 1a descritas en las SEQ ID NO: 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 26, pueden servir para caracterizar el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención en realizaciones preferidas adicionales.

30 De manera análoga al alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de ORF 1a tal como se presentan en la tabla 2, pueden efectuarse alineamientos de las secuencias de aminoácidos putativas a partir de las secuencias de ácido nucleico recortadas de la tabla 2, las SEQ ID NO: 4, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 y 26. Las secuencias de aminoácidos resultantes, traducidas informáticamente, se presentan en el presente documento como las SEQ ID NO: 5, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, y 27. La secuencia de referencia es la SEQ ID NO: 5, la secuencia de aminoácidos putativa de parte de la ORF 1a del Aislado 19. También se hizo el alineamiento usando el programa Align+, alineando sobre la longitud completa de la SEQ ID NO: 5. Los resultados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3: Lista de porcentajes de identidad de secuencia de aminoácidos entre la SEQ ID NO: 5 (que es una traducción de una parte de la ORF 1a del aislado 19), y la secuencia de la parte correspondiente de la ORF 1a de otros aislados de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, así como de ANV1 y TAstV2.

Aislado/nombre del virus	% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO, o n.º de referencia de GenBank
637	97	SEQ ID NO: 11
686	97	SEQ ID NO: 13
714	97	SEQ ID NO: 15
715	99	SEQ ID NO: 17
1736	96	SEQ ID NO: 19
2383	94	SEQ ID NO: 21
2388	93	SEQ ID NO: 23
7279	96	SEQ ID NO: 25
161317	97	SEQ ID NO: 27
ANV1	88	GenBank: BAA92848 (parte: 734 - 864)
TAstV2	< 40	GenBank: Q9IL16 (parte: 810-930; casi indetectable)

5 El alineamiento de aminoácidos detallado se representa en la figura 2.

El resultado de este análisis de secuencia de aminoácidos muestra un resultado comparable con los resultados en la tabla 2: las secuencias de aminoácidos de los aislados de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención están más relacionadas entre sí, que cuando se comparan con otros Astrovirus aviares. Los porcentajes de identidad de las secuencias de aminoácidos de los diversos aislados de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención con la SEQ ID NO: 5, son de entre el 93 y el 99 %, mientras que la identidad con ANV1 es menor, del 88 %.

10

Por lo tanto, en una realización preferida, la invención se refiere a un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, caracterizado por que el ORF 1a de dicho Astrovirus aviar codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 93 % con la SEQ ID NO: 5.

15

Más preferentemente, la invención se refiere a un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, caracterizado por que el ORF 1a de dicho Astrovirus aviar codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 94 % con la SEQ ID NO: 5, aún más preferentemente un 95, 96, 97, 98, 99, o 100 % de identidad, en ese orden de preferencia.

20

A continuación de la SEQ ID NO: 5, cualquiera de las secuencias de nucleótidos parciales de ORF 1a traducidas putativamente descritas en las SEQ ID NO: 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, y 27, pueden servir para caracterizar el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención en realizaciones preferidas adicionales.

25

Además de la secuenciación y alineamiento de nucleótidos, el marcador genético positivo de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención puede identificarse usando una prueba PCR para detectar la presencia de los 12 nucleótidos en la región ORF 1a de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, que no están presentes en la ORF 1a de ANV1, por ejemplo, en muestras de pájaros que padecen enfermedad intestinal o locomotora.

30

Por lo tanto, en una realización adicional preferida, el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención se caracteriza por que puede producirse un producto de PCR de aproximadamente 260 nucleótidos a partir de la ORF 1a de dicho Astrovirus aviar en un ensayo de PCR que usa un conjunto de cebadores representados en las SEQ ID NO: 30 y 31.

35 Los cebadores de PCR que se van a usar son:

SEQ ID NO: 30: 5'- GTY CTY ACC GAR GAR GAR TAY C -3'
 SEQ ID NO: 31: 5'- AAD GTT ATY CTC CTA RGB TKH C -3'

40 Los inventores hacen referencia a estos cebadores como cebadores 29 y 30, respectivamente.

Estos cebadores hibridan con nucleótidos correspondientes al número de nucleótido 2252 y posteriores y al número de nucleótido 2499 de ANV1 (SEQ ID NO: 1) y procediendo en sentido inverso.

El producto de la PCR que se produjo fue visible en un gel como una banda de aproximadamente 260 nucleótidos (esto es incluyendo la longitud de los cebadores en sí). Esta banda solo se produce cuando el material de partida contiene ADN que comprende la región ORF 1a de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, ya que solo estos comprenden los 12 nucleótidos que no están presentes en la ORF 1a de ANV1. Una representación de la unión específica de los cebadores de SEQ ID NO: 30 y 31, en relación con la localización de la región de 12 nucleótidos se presenta en la figura 4.

En dichos ensayos PCR, se determina la especificidad y la sensibilidad mediante los cebadores de PCR específicos empleados, en particular por la secuencia y longitud de los cebadores. Entonces, puede lograrse la optimización de la selectividad y sensibilidad adaptando las condiciones de reacción y ciclación, tales como la temperatura y la duración de las etapas de reacción, como es sabido por un experto en la materia.

Estas, y otras técnicas de biología molecular se explican en gran detalle en libros de texto convencionales, tales como Sambrook y Russel: "Molecular cloning: a laboratory manual" (2001, Cold Spring Harbour Laboratory Press; ISBN: 0879695773); Ausubel et al., en: Current Protocols in Molecular Biology (J. Wiley and Sons Inc, NY, 2003, ISBN: 047150338X); C. Dieffenbach y G. Dveksler: "PCR primers: a laboratory manual" (CSHL Press, ISBN 0879696540); y "PCR Protocols", por: J. Bartlett y D. Stirling (Humana press, ISBN: 0896036421).

De manera conveniente, la reacción PCR que usa los cebadores de las SEQ ID NO: 30 y 31 se combina con, y sigue directamente a la reacción de RT necesaria para producir ADNc; haciendo del ensayo combinado un ensayo de RT-PCR, tal como se describe en los ejemplos.

Un ensayo RT-PCR tal como se ha descrito, se ha aplicado por los inventores en diversas muestras; se obtuvo un resultado positivo con muestras de los aislados de los nuevos Astrovirus aviares de acuerdo con la invención; siendo un resultado de la PCR "positivo" la visualización de un producto de reacción de aproximadamente 260 pares de bases tras la electroforesis, en relación a muestras de control positivo y negativo adecuadas. Sin embargo, se observó consistentemente que las muestras de RT-PCR preparadas a partir de los Astrovirus aviares relacionados, ANV1 y Astrovirus de pollo 2 (CAstV2) eran negativas en la PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 30 y 31.

Un ejemplo de un resultado de ensayo PCR similar se representa en la figura 5, mostrando una fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, iluminado con luz UV, sobre el cual se corrieron los productos de una PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 30 y 31. Solo una muestra de Aislado 19 tuvo una reacción positiva; las muestras que contenían ANV1 o CAstV2 fueron negativas, así como lo fueron los controles negativos.

Sorprendentemente, se observó un efecto patológico altamente destacable y sorprendente tras la infección e incubación de huevos de ave embrionados con un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención: los embriones afectados mostraron una tinción rojo brillante de las patas y las puntas de las alas. Esto no se ha observado o descrito anteriormente. Además, los embriones infectados mostraron otras características, pero menos distintivas: una tinción roja clara generalizada, edema en el abdomen, y un hígado que estaba considerablemente inflamado y se había vuelto rojo oscuro/púrpura.

Esta patología específica se observó aproximadamente 2 - 7 días después de la infección de los huevos de pollo SPF embrionados, y prácticamente siempre dio lugar a la muerte del embrión, dependiendo del título de virus que se inoculó.

Por comparación, la inoculación de ANV1 en huevos embrionados se efectuó conjuntamente, usando condiciones de ensayo similares. ANV1 también indujo inflamación del hígado, pero en ese caso los hígados tuvieron un color aún más oscuro, y el color general del embrión fue rojo oscuro. Sin embargo, ANV1 nunca indujo la coloración roja brillante de las patas y las puntas de las alas que se observó para los aislados del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, en una realización adicional preferida, el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención se caracteriza por que es capaz de inducir una coloración roja de las patas y las puntas de las alas de embriones de pollo, tras su inoculación en los huevos de pollo SPF embrionados de aproximadamente 5 - 7 días de edad, seguido de incubación durante 2 - 7 días, o incluso más tiempo cuando sea adecuado.

Tal como se ha descrito, los huevos de pollo SPF embrionados y el equipo para su incubación están disponibles comercialmente. Típicamente, la incubación de los huevos de pollo embrionados se efectúa a aproximadamente 35 - 39 °C, en incubadores de atmósfera humidificada.

La inoculación puede ser mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo, la CAM, el saco vitelino o la ruta alantoica.

Como apreciarán los expertos en la materia, la coloración roja brillante específica de las patas y las puntas de las alas puede no llegar a ser visible en situaciones ocasionales en donde, por ejemplo, la cantidad de virus que se inoculó era extremadamente baja (no permitiendo el "asalto" del virus) o extremadamente alta (causando mortalidad

antes de que pudiese aparecer la coloración); o en los casos donde los embriones no tienen suficiente calidad como para permitir la replicación vírica. En general, la coloración roja brillante puede observarse tras la incubación de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 10^6 DIH50/huevo (DIH50 = 50 % de la dosis infecciosa en huevo).

5 Un aislado particular de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, denominado aislado 19, se purificó y amplificó adicionalmente para servir como muestra de referencia y depositarse. El aislado se purificó mediante dilución limitante en células de hígado embrionario de pollo (CEL). En cada ocasión se pasó la dilución mayor que seguía induciendo cpe en las células CEL. A continuación este virus purificado se amplificó mediante tres rondas de amplificación vírica en la cavidad alantoica de huevos de pollo SPF embrionados. El fluido alantoico se recogió y
10 almacenó congelado. Este virus purificado se tituló en huevos de pollo SPF embrionados, y se observó que tenía un título de $6,1 \text{ Log}_{10}$ DIH50/ml. Este material se liofilizó en un tampón estabilizador convencional y se almacenó a -20 °C. Se confirmó la esterilidad. Las muestras de este material de virus se depositaron entonces en la "Collection Nationale de Cultures de Microorganismes" (CNCM) del Institut Pasteur, en París, Francia, con el número de depósito: CNCM I-3895, en 23 de Enero de 2008.

15 Por lo tanto, en una realización adicional preferida, el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención es un virus como el depositado con el número CNCM I-3895 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), del Institut Pasteur en París, Francia.

20 Aunque la muestra que se purificó, amplificó, y depositó fue el aislado denominado "aislado 19", sin embargo, uno cualquiera de los aislados de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, descritos en la tabla 1, puede servir como muestra de referencia para el nuevo grupo de Astrovirus aviares de acuerdo con la invención.

25 Para el cultivo *in vitro* y para ensayar los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, pueden usarse varios sistemas de cultivo: por ejemplo, líneas celulares (aviares), tales como células primarias, como CEL o células de riñón embrionario de pollo (CEK), pueden usarse de manera ventajosa. La preparación de cultivos de células CEL o CEK de huevos de pollo SPF embrionados se conoce bien en la materia.

30 Especialmente, las células CEK son adecuadas para controlar el crecimiento viral, y medir la cantidad y viabilidad vírica. Aunque es atípico el efecto citopático (cpe) que el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención produce en estas células, las células infectadas pueden verse claramente como células redondeadas, que se encrespan a partir de la monocapa, y progresan hacia la lisis celular.

35 Por lo tanto, pueden diseñarse ensayos de titulación vírica usando diluciones progresivas de muestras víricas, y puntuando la dilución más alta de virus que aún produce cpe. Entonces puede expresarse el título vírico como el 50 % de la dosis infecciosa en cultivo tisular (DICT50) por mililitro, según se calcula mediante el método Spearman-Kärber (descrito en: D. Finney: Statistical method in biological assay, C. Griffin & Co., Londres, ISBN 0195205677). Dichas técnicas se conocen bien por los expertos en la materia.

40 De este modo, el virus puede cultivarse en matraces de cultivo tisular o placas de microtitulación para diversas pruebas y fines. Comúnmente, es beneficioso para en primer lugar adaptar a los virus aislados en el campo al cultivo *in vitro* en células, aplicando unos pocos pases en dichas células, antes de su uso en pruebas o titulaciones víricas.

45 Como alternativa, las pruebas y las titulaciones pueden llevarse a cabo en huevos embrionados, preferentemente huevos de pollo SPF. Por ejemplo, puede efectuarse la titulación vírica inoculando muestras cada vez más diluidas en el saco vitelino de huevos de pollo SPF embrionados de 6 días de edad. Tras puntuar el número de embriones infectados o muertos, el título resultante de la muestra ensayada puede expresarse en DIH50 por mililitro, por ejemplo, usando el método de Spearman-Kärber (anteriormente citado).

50 Para el virus depositado, se confirmó su capacidad para provocar patologías en pollos y pavos recién eclosionados en condiciones de laboratorio en una serie de pollos de pruebas experimentales. La inoculación fue a través de múltiples rutas: intramuscular, oral, y ocular. Varios de los pollos inoculados desarrollaron signos graves de enfermedad, mientras que los pollos infectados con simulado no tuvieron síntomas. Los síntomas observados fueron mortalidad, depresión general, y diarrea de leve a grave. Tras la histopatología, se observaron nefritis y enteritis. No se observó enfermedad de las patas o articulaciones, aunque tampoco era de esperar ya que los pollos usados para estos experimentos eran demasiado jóvenes (3 - 6 semanas), y/o no suficientemente pesados (pollos SPF de tipo ponedor) para manifestar dichos problemas.
55

60 En el presente documento se presentan secuencias de nucleótidos de regiones adicionales del virus depositado para su caracterización adicional: ORF 1b y ORF 2. Las secuencias de nucleótidos respectivas y de aminoácidos putativas se presentan en el presente documento como las SEQ ID NO: 5-8, véase la tabla 1.

65 Los diferentes cebadores que se usaron para determinar estas secuencias de nucleótidos adicionales se presentan en el presente documento como las SEQ ID NO: 32 - 34, y se describen en la tabla 4; por conveniencia, esta tabla incluye también los otros cebadores de PCR y secuenciación descritos en el presente documento.

Tabla 4: Descripción de cebadores de PCR y de secuenciación tal como se describen en el presente documento

SEQ ID NO:	Códigos de cebador de los inventores	Hibrida con:	Localización de la primera base en la SEQ ID NO: 1; dirección	Secuencia (5' → 3')
Cebador de reacción de RT				
3	17	Región de extremo 3' de AAstV	6731, rev	TCg WTS CTA CYC
Cebadores de detección				
30	29	Orf 1a del nuevo AAstV según la invención	2252, dir	gTY CTY ACC gAR gAR gAR TAY C
31	30		2499, rev	AAD gTT ATY CTC CTA RgB TKH C
Cebadores de secuenciación				
28	F-II	Orf 1a de AAstV	2171, dir	AAA ggK AAg ACD AAg ARR RAC Mg
29	R-II-3		2640, rev	TCg CCT TCT ggA Agg TCT TCA
32	20	Orf 1b de AAstV	3721, dir	Tgg HCM CCY TTY TTY ggH g
33	21		4020, rev	RTT RTC MAC DgT KgT DgA RWA YTg
34	ORF2-R	Orf 2 de AAstV	6622, rev	TTA gAT CTg AAA gCg CCg gAg g
AAstV = Astrovirus aviar; rev = reverso; dir = directo				

Un método adicional para proporcionar caracterización adicional de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, con la muestra de virus depositada como referencia, es mediante la determinación de sus características inmunológicas mediante serotipado, preferentemente usando ensayos VN o IFT.

En todas las pruebas, el nuevo Astrovirus aviar demostró ser inmunológicamente distinto de otros virus aviares, ya que no pudo neutralizarse, y no se unió específicamente por anticuerpos específicos para otros diversos virus aviares: Reovirus, Adenovirus aviares (tipos 1, 2, 4, 5, y 8), virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la enfermedad bursal infecciosa, enterovirus aviar (aislados 1821/9 y FP3), síndrome de la puesta de huevos y virus de la gripe aviar. Este fue el caso también para anticuerpos específicos para los Astrovirus aviares ANV1 o CAstV2, mientras que estos sueros neutralizaron de manera eficaz a sus virus donante: ANV1 y CAstV2 hasta una dilución de 1:640 o de 1:10240, respectivamente.

Sin embargo, se neutralizó de manera eficaz y selectiva una muestra del virus aislado 19 depositado por un antisuero de pollo generado contra el aislado 19 en pollos SPF que se infectaron experimentalmente con el virus del aislado 19. Después de proporcionar inoculaciones de refuerzo, pudo obtenerse un antisuero específico. La lectura usada para la neutralización del virus en este ensayo fue la prevención de la embriopatología mediante la neutralización.

Los resultados de los experimentos inmunológicos en los que los anticuerpos específicos solo reconocieron y neutralizaron a los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, demuestran que estos virus pertenecen a un serotipo viral nuevo y único.

Esto puede ponerse en práctica, por ejemplo, en una realización adicional preferida, en la que el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención se caracteriza por que dicho Astrovirus aviar puede neutralizarse en un ensayo de neutralización de virus, por anticuerpos dirigidos contra una muestra del Astrovirus depositado con el número CNCM I-3895 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), del Institut Pasteur en París, Francia.

También es posible una estrategia alternativa para la generación de anticuerpos usando el virus depositado de acuerdo con la invención. Por ejemplo, puede usarse una muestra de virus que se va a investigar por ser un (derivado de) Astrovirus aviar de acuerdo con la invención para inducir anticuerpos y dichos anticuerpos pueden a su vez ensayarse respecto de su capacidad para unirse o incluso para neutralizar un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención. Convenientemente, dichos anticuerpos pueden ensayarse en una muestra del virus depositado de acuerdo con la invención.

Con este fin, puede inocularse el virus de ensayo o una fracción o preparación del mismo en un animal. El animal usado para la generación de dichos anticuerpos puede ser, en principio, cualquier animal, pero se usa preferentemente un ratón, rata, conejo, hámster, cabra o pollo. Los anticuerpos producidos de este modo pueden ensayarse respecto de la unión o neutralización a un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, por ejemplo, convenientemente encargando una muestra del virus depositado de acuerdo con la invención a la CNCM. Esta puede cultivarse, por ejemplo en huevos o células CEK o CEL, u otros sustratos, y finalmente incubarse con el anticuerpo provocado con la muestra de virus de ensayo. La detección de la unión del anticuerpo puede efectuarse, por ejemplo, mediante ensayo IFT o VN.

Por lo tanto, esto constituye un método para la identificación y caracterización de un virus vivo o inactivado, o de una fracción o preparación del mismo, como un Astrovirus aviar o un derivado de un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, en una realización adicional preferida, la invención proporciona un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, que se caracteriza por que dicho virus es capaz de inducir anticuerpos que pueden neutralizar una muestra de los Astrovirus depositados de acuerdo con la invención en un ensayo VN.

Los protocolos para configurar un ensayo VN se conocen bien en la técnica, y se encuentran dentro de las habilidades rutinarias de un experto en la materia. Las preferencias y detalles para los ensayos VN se han descrito anteriormente.

Tal como es evidente a partir de los resultados de los ensayos inmunológicos usando anticuerpos específicos para los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, la invención también proporciona un anticuerpo que puede unirse y que puede neutralizar a un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención es un anticuerpo o fragmento del mismo que puede neutralizar al Astrovirus aviar tal como se ha depositado con el número CNCM I-3895 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), del Institut Pasteur en París, Francia, en un ensayo de neutralización de virus.

Dichos anticuerpos de acuerdo con la invención pueden obtenerse y producirse mediante diversos modos, todos bien conocidos y disponibles para un experto en la materia. Por ejemplo, pueden producirse los anticuerpos en animales experimentales mediante inoculación (repetida) tal como se ha descrito anteriormente.

Como alternativa, pueden producirse anticuerpos por linfocitos B inmortalizados, como en la tecnología de hibridoma. Las mejoras modernas de la tecnología de hibridoma clásica han hecho que esta técnica sea más eficaz y productiva, por ejemplo, potenciando la cantidad deseada de esplenocitos antes de la fusión, mediante selección positiva (paneo), seguido de expansión en cultivo con una mezcla de citocinas. Asimismo, la técnica de fusión se ha mejorado, cambiando de la fusión de polietilenglicol clásica, a electrofusión.

En una estrategia alternativa adicional, pueden obtenerse anticuerpos mediante el uso de técnicas biológicas moleculares y expresión en sistemas de expresión recombinantes. Las técnicas biológicas moleculares permiten la adaptación de dichos anticuerpos para emparejarse mejor con la firma de anticuerpos de las especies diana que se van a tratar, o el diseño de anticuerpo que portan dos regiones de unión con especificidades diferentes. El desarrollo del sistema de expresión permite la configuración de sistemas de expresión de alto volumen, tales como expresión en plantas.

También se conocen en la técnica sistemas de expresión recombinante y usan por ejemplo: células bacterianas (por ejemplo, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Bacillus*, *Caulobacter* etc.), levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*), insecto (*Spodoptera*, *Trichoplusia*), mamífero (por ejemplo, ovario de hámster chino), o vegetales (tabaco, patata, etc.). Estas células pueden transformarse con una construcción de expresión que porta la secuencia heteróloga que va a expresarse. Asimismo, se conocen sistemas combinados, que usan un microorganismo recombinante que comprende el ácido nucleico que se va a expresar, pudiendo cultivarse dichos microorganismos en células *in vitro* para producir la proteína deseada a la escala deseada. Un ejemplo es el sistema de expresión de baculovirus/célula de insecto. Finalmente, están disponibles los denominados sistemas de expresión sin células para la expresión sin células de una molécula de ADN recombinante adecuada.

La expresión "un anticuerpo o fragmento del mismo" pretende indicar que tanto las moléculas de inmunoglobulina completas como partes de las mismas se consideran dentro del alcance del anticuerpo de acuerdo con la invención. Los fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la invención son moléculas de proteína que aún pueden unirse a un epítipo de un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención. Los ejemplos son FAB, scFv, Fv, dAb, o fragmentos Fd, todos bien conocidos en la técnica.

Dichos fragmentos pueden obtenerse a partir de anticuerpos intactos mediante, por ejemplo, digestión química o enzimática. Como alternativa, dichos fragmentos pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de un sistema de expresión recombinante, por ejemplo, un sistema de presentación en fagos.

Tal como se conoce bien por los expertos en la materia, la unión de un anticuerpo o fragmento del mismo a un virus abarca el reconocimiento de epítopos en la partícula del virus. Con frecuencia, estos epítopos se forman mediante conformaciones lineales o tridimensionales de moléculas presentadas en la partícula vírica. Como resultado, las preparaciones de un virus o fracciones de los mismos pueden unirse por anticuerpos o fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención, en tanto que estas preparaciones o fracciones aún contengan y presenten los epítopos correctos en la forma correcta. En el caso del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, la proteína vírica presentada más prominentemente al sistema inmunitario es la proteína de la cápsida codificada a partir de la ORF 2.

El experto en la materia también apreciará que cuando el anticuerpo de acuerdo con la invención se produce mediante inoculación de un animal, el suero del animal obtenido es un antisuero policlonal, lo que significa que el anticuerpo contiene una mezcla de anticuerpos que pueden unirse a una gran variedad de epítopos. En la práctica, esto proporciona múltiples interacciones, que permiten la unión eficaz de preparaciones o fragmentos de la proteína vírica, aunque estas pueden no poseer, o pueden no presentar de manera adecuada, todos los epítopos que están disponibles normalmente en una partícula vírica viva intacta.

Como alternativa, el anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un anticuerpo monoclonal, por ejemplo, tal como se produce mediante la tecnología de hibridoma, o el anticuerpo de acuerdo con la invención puede ser un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab. En este caso, el anticuerpo o fragmento tiene una capacidad muy reducida para reconocer diferentes epítopos, ya que normalmente solo se unirá específicamente a un solo epítipo. Por consiguiente, cuando este epítipo particular no está presente o no se presenta en el fragmento o preparación del virus, puede no unirse en absoluto a dicho anticuerpo monoclonal o fragmento de anticuerpo.

Los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden usarse de diversos modos; para la caracterización de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, para diagnósticos, para terapia, y/o para fines de verificación de calidad.

La invención proporciona la producción del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención a una escala industrial. Esto puede lograrse cultivando dicho virus en células hospedadoras en sistemas *in vivo* o *in vitro*. Los sistemas *in vitro* comprenden líneas celulares primarias o inmortalizadas. Los ejemplos de células primarias son células CEK o CEL. Un ejemplo de una línea celular inmortalizada es la línea celular LMH (Kawaguchi et al., Cancer Res., vol. 47, p. 4460-4464). Los ejemplos de sistemas *in vivo* son cultivo en huevos de aves embrionados, o en aves inoculadas. Especialmente, pueden escalarse convenientemente cultivos en células o huevos; por ejemplo, los cultivos celulares pueden mantenerse en contenedores de diversos tamaños, tales como matraces, botellas rotatorias, o incluso fermentadores. Las técnicas y el equipamiento para la tecnología de cultivo celular a cualquier escala se conocen bien y están fácilmente disponibles a través de proveedores comerciales.

Por lo tanto, la invención proporciona en un aspecto adicional una célula hospedadora infectada con un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención.

Asimismo, la invención proporciona un método para producir un Astrovirus aviar de acuerdo con la invención que comprende la multiplicación del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención en un sistema adecuado, y recoger el material vírico.

Las caracterizaciones descritas en el presente documento del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención no solo se refieren a dichos Astrovirus aviares en una forma intacta, competente para replicación. Como apreciará un experto en la materia, la presente invención proporciona preparaciones de este virus en muchas formas diferentes. Estas comprenden, por ejemplo, preparaciones en las que el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención se ha inactivado, o preparaciones en las que dicho virus se ha fraccionado de una o más maneras, (bio)químicamente o físicamente, por ejemplo, mediante extracción, lisado, digestión, homogenización, o sonicación.

Los métodos para inactivar virus se conocen bien e incluyen, por ejemplo, inactivación química o física, tal como inactivación con formalina, beta-etanolamina, o beta-propiolactona; también calentamiento o irradiación con luz UV, rayos X, o radiación radiactiva.

También se conocen múltiples métodos de fraccionamiento, por ejemplo, extracción o lisado con un detergente, tal como Triton® X-100; digestión con tripsina; homogenización mediante congelación-descongelación o prensa celular

de French; o sonicación mediante ultrasonidos.

5 El material de partida para dichas preparaciones puede ser un Astrovirus aviar purificado (vivo o inactivado) de acuerdo con la invención, pero también una célula hospedadora de acuerdo con la invención, o un cultivo celular o una parte del mismo que comprende una célula hospedadora o un astrovirus aviar de acuerdo con la invención. Por ejemplo, dicha parte de un cultivo celular puede ser un sobrenadante o un sedimento de un cultivo celular centrifugado. Evidentemente, estos cultivos celulares o partes de los mismos pueden a su vez convertirse en preparaciones, tales como un extracto, lisado, digestión, homogenizado, o sonicado, tal como se ha descrito.

10 Dichas preparaciones de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención contienen uno o más antígenos y epítopos del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención.

15 Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a una preparación antigénica obtenible a partir del Astrovirus aviar en el que el Astrovirus aviar está en forma inactivada.

La preparación antigénica de acuerdo con la invención puede unirse por anticuerpos o partes de los mismos de acuerdo con la invención, o puede usarse en sí para inducir la unión o anticuerpos neutralizantes o partes de los mismos. Esto puede aplicarse ventajosamente en vacunas y diagnósticos tal como se describirá más adelante.

20 Las preparaciones antigénicas de acuerdo con la invención son, por ejemplo, proteínas del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, o partes de dichas proteínas. Estas proteínas o partes de las mismas pueden obtenerse mediante aislamiento a partir de dicho virus. Sin embargo, estas proteínas o partes de las mismas también pueden producirse de manera conveniente mediante técnicas de expresión de ADN recombinante usando ácidos nucleicos del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención. Por ejemplo, pueden usarse secuencias de ácidos nucleicos de parte de las regiones ORF 1a, tal como se describen en una cualquiera de las SEQ ID NO: 4, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24 o 26; tal como se ha descrito, estas secuencias de ADNc están relacionadas en tanto que tienen identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 88 % con la SEQ ID NO: 4.

30 Por lo tanto, la invención proporciona en un aspecto adicional una molécula de ADN que comprende una región que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 88 % con la SEQ ID NO: 4.

También pueden usarse ácidos nucleicos de ORF 1b u ORF2 tal como se describen en las SEQ ID NO: 6 u 8.

35 Dichas secuencias de ácido nucleico y fragmentos de ADNc pueden clonarse y expresarse usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante subclonación en una molécula de ADN recombinante para manipulación adicional. La molécula de ADN recombinante puede ser un vector, tal como un plásmido bacteriano. Preferentemente, el ácido nucleico del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención está unido operativamente a una secuencia de control de la expresión, tal como un promotor, permitiendo su expresión en un sistema de expresión o célula hospedadora adecuada. Como alternativa, el ácido nucleico, ADNc, o molécula de ADN recombinante puede introducirse en microorganismos portadores recombinantes, tales como bacterias o virus.

40 De manera análoga, basándose en las secuencias de aminoácidos putativas descritas en las SEQ ID NO: 5, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, y 27, y su relación, la invención proporciona en un aspecto adicional una proteína que comprende una región que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 93 % con la SEQ ID NO: 5.

Estas realizaciones tienen una gran utilidad práctica y ventajosa en la aplicación de vacunas y diagnósticos, tal como se describirá más adelante.

50 Puede prepararse una vacuna a partir de patógenos microbiológicos vivos o inactivados, tales como virus, o de fragmentos de dichos microorganismos. Dichos microorganismos se producen comúnmente de manera industrial en volúmenes menores o mayores, mediante incubación en células, órganos o tejidos, huevos embrionados, o en animales hospedadores. Después de recoger una suspensión que comprende el microorganismo, esta suspensión se formula en una vacuna y se envasa el producto final. Después de una comprobación exhaustiva de la calidad, la cantidad y la esterilidad, dichos productos vacunales se liberan para su comercialización.

60 Las técnicas y consideraciones generales en la vacunología se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en las regulaciones gubernamentales y en libros de texto, tales como: "Veterinary vaccinology" (P. Pastoret et al. ed., 1997, Elsevier, Ámsterdam, ISBN: 0444819681), y: "Remington: the science and practice of pharmacy" (2000, Lippincot, USA, ISBN: 683306472).

65 En la técnica se conoce comúnmente que una vacuna presenta una composición farmacéutica que comprende un compuesto inmunogénico en un vehículo farmacéuticamente aceptable. El compuesto inmunogénico es un microorganismo vivo o inactivado, o una subunidad del mismo, capaz de inducir una activación del sistema inmunitario de una diana.

Sorprendentemente, se descubrió que el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, y las preparaciones antigénicas, células hospedadoras, anticuerpos, ácidos nucleicos, proteínas, así como los métodos para su preparación, cultivo, identificación y cuantificación pueden aplicarse en vacunas y con fines diagnósticos. Dichas vacunas sirven para proteger a un animal diana frente a la infección por el Astrovirus aviar, o reducir la replicación de dicho virus o los síntomas de la enfermedad que causa. Dichos ensayos diagnósticos permiten la detección de los virus o sus antígenos, por ejemplo, en muestras de campo de animales o preparaciones víricas.

En combinación, las vacunas y diagnósticos permiten la identificación y la defensa contra la infección y/o enfermedad por el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención.

La capacidad de vacunación se demostró mediante los experimentos animales descritos, en los que se inocularon pollos con el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención. Esto dio lugar a la producción de anticuerpos altamente específicos. Además, se demostró que estos anticuerpos son capaces de neutralizar específicamente a los Astrovirus aviarios de acuerdo con la invención. Como se conoce en la técnica, la inducción de anticuerpos neutralizantes es una etapa importante en la factibilidad de una vacuna efectiva e inmunoprotectora.

Las inoculaciones repetidas de los animales de ensayo no solo proporcionaron un refuerzo para los niveles de anticuerpo producidos, sino que también sirvieron como infecciones de exposición, que pudieron tolerarse y superarse por un gran número de las aves en el ensayo.

Los Astrovirus aviarios de acuerdo con la invención, o partes de los mismos, pueden por lo tanto formularse en una composición farmacéutica adecuada, y pueden aplicarse a aves en forma de una vacuna.

Se encuentra dentro del alcance de un experto en la materia optimizar adicionalmente esta vacuna, por ejemplo, refinando la eficacia y seguridad de la vacuna, de tal forma que proporciona protección suficiente con un nivel aceptable de reacción a la vacuna. Esto puede efectuarse adaptando la dosis de vacuna, o usando la vacuna en otra forma o formulación, o adaptando los otros constituyentes de la vacuna (por ejemplo, el estabilizante o el adyuvante), o mediante aplicación a través de una ruta diferente.

Las variantes bien conocidas de una vacuna para la invención pueden usar, por ejemplo, los nuevos Astrovirus aviarios en una forma viva o inactivada; puede ser una vacuna de subunidad cuando se usa la preparación antigénica y/o la proteína de acuerdo con la invención; puede estar en forma de una vacuna pasiva cuando se usa el anticuerpo o fragmento del mismo de acuerdo con la invención; o puede estar en la forma de una vacuna de ADN cuando se usa la molécula de ADN de acuerdo con la invención.

Por lo tanto, otro aspecto de la invención proporciona una vacuna que comprende el Astrovirus aviar tal como se ha depositado con el número CNCM I-3895 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), del Institut Pasteur en París, Francia, o el anticuerpo o fragmento del mismo contra el Astrovirus depositado, o la preparación antigénica del Astrovirus depositado, o la molécula de ADN, o la proteína de acuerdo con la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De manera análoga, la invención se refiere en aspectos adicionales a un compuesto o composición para su uso en una vacuna para aves de corral, en el que el compuesto o composición es el Astrovirus aviar tal como se depositó con el número CNCM I-3895 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), del Institut Pasteur en París, Francia, o el anticuerpo o fragmento del mismo contra el Astrovirus depositado, o la preparación antigénica del Astrovirus depositado, o la molécula de ADN, o la proteína de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere al uso de un compuesto o composición para la fabricación de una vacuna para aves de corral, en el que el compuesto o composición es el Astrovirus aviar tal como se depositó con el número CNCM I-3895 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), del Institut Pasteur en París, Francia, o el anticuerpo o fragmento del mismo contra el Astrovirus depositado, o la preparación antigénica del Astrovirus depositado, o la molécula de ADN, o la proteína de acuerdo con la invención.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para la fabricación de una vacuna para aves de corral, en el que un compuesto o composición se mezcla con un vehículo farmacéutico adecuado, y en el que el compuesto o composición es el Astrovirus aviar tal como se depositó con el número CNCM I-3895 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), del Institut Pasteur en París, Francia, o el anticuerpo o fragmento del mismo contra el Astrovirus depositado, o la preparación antigénica del Astrovirus depositado, o la molécula de ADN, o la proteína de acuerdo con la invención.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede ser, por ejemplo, agua estéril, una solución salina fisiológica, o un tampón adecuado para el fin. En una forma más compleja, el vehículo puede comprender por sí mismo otros compuestos, tales como un adyuvante, un antígeno adicional, una citocina, etc.

La vacuna de acuerdo con la invención puede usarse para tratamiento tanto profiláctico como terapéutico.

El término "vacuna" implica la presencia de una cantidad inmunológicamente eficaz del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, y la presencia de un vehículo farmacéuticamente aceptable.

5 Lo que constituye una "cantidad inmunológicamente eficaz" para la vacuna de acuerdo con la invención depende del efecto deseado y de las características del Astrovirus aviar y del organismo diana. La determinación de la cantidad eficaz se encuentra dentro de las capacidades de un practicante experto, por ejemplo, controlando la respuesta inmunológica después de la vacunación, o después de exposición a la infección, por ejemplo, controlando los signos clínicos de enfermedad de la diana, parámetros serológicos, o mediante re-aislamiento del patógeno, en comparación con las respuestas observadas en los animales no vacunados.

10 El uso de cantidades muy altas del Astrovirus aviar, la preparación antigénica, el anticuerpo o fragmento del mismo, la molécula de ADN, o la proteína de acuerdo con la invención en una vacuna aunque pueda ser inmunológicamente muy eficaz, será menos atractivo por motivos comerciales. Una cantidad preferida de cualquiera de estos compuestos o composiciones de acuerdo con la invención, comprendida en una vacuna de acuerdo con la invención, es de entre el 0,1 y el 90 % del volumen final de la vacuna. Más preferentemente, la cantidad es de entre el 1 y el 50 %, el 1 y el 25 %, y el 1 y el 10 %, en ese orden de preferencia.

15 En el caso de una vacuna inactivada o de subunidad, el compuesto o composición de acuerdo con la invención puede expresarse en unidades de ELISA. Las cantidad de unidades de ELISA que son eficaces necesitan determinarse en relación a la unidad de ELISA de una muestra estandarizada que proporcione una eficacia determinada.

20 En el caso de una vacuna viva de acuerdo con la invención, puede usarse una cantidad de ufp (unidades formadoras de placa), ufc (unidades formadoras de colonias), DICT50, DIH50 o DLE50 (50 % de la dosis letal embrionaria), dependiendo de qué cuál sea el modo conveniente de cuantificar la dosis de vacuna de Astrovirus aviar. Por ejemplo, puede usarse ventajosamente una dosis de vacuna de Astrovirus aviar en un intervalo entre 1 y 10^6 DIH50 por dosis de vacuna; preferentemente, un intervalo entre 10 y 10^5 DIH50/dosis, más preferentemente entre 10^2 y 10^4 DIH50/dosis.

25 En una realización preferida, la invención se refiere a una vacuna de acuerdo con la invención en la que el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención está en forma viva.

30 Las vacunas vivas en general tienen las propiedades ventajosas de que solo se requiere poca cantidad de inóculo, ya que el microorganismo se replica por sí mismo. Asimismo, esto incluye generalmente una respuesta inmunitaria sólida y eficaz, con una memoria inmunológica adecuada.

35 Tal como se conoce en la técnica, las vacunas vivas pueden aplicarse convenientemente en forma de vacunas vivas atenuadas, lo que significa que el virus de vacuna tiene una virulencia o patogenicidad reducida en comparación con el aislado vírico original. Los métodos para la atenuación vírica se conocen en la técnica y comprenden, por ejemplo: pase continuado a través de animales o en cultivos celulares; atenuación química; o atenuación mediante técnicas de biología molecular.

40 En una realización preferida alternativa, la invención se refiere a la vacuna de acuerdo con la invención en la que el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención está inactivado.

45 Los métodos y materiales para la inactivación vírica se han descrito anteriormente. Dichas vacunas inactivadas tienen en general la ventaja de ser más seguras que las vacunas vivas, ya que no exponen al hospedador a cualquier Astrovirus aviar vivo que se replique potencialmente patógeno.

50 En una realización preferida adicional, la vacuna de acuerdo con la invención comprende además un adyuvante.

55 Un adyuvante es una sustancia inmunoestimuladora que refuerza la respuesta inmunitaria del hospedador de una manera no específica. Se conocen en la técnica muchos adyuvantes diferentes. Los ejemplos de adyuvantes usados frecuentemente son dipéptidos de muramilo, lipopolisacáridos, varios glucanos o glicanos, Carbopol®, hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$). Estos pueden combinarse con diferentes emulsiones, tales como emulsiones de agua en aceite (ag./ac.), emulsiones ac./ag. y dobles emulsiones ag./ac./ag. Los adyuvantes oleosos adecuados para su uso en emulsiones oleosas son, por ejemplo, aceites minerales o aceites metabolizables. Los aceites minerales son, por ejemplo, Bayol®, Marcol® y Drakeol®; los aceites metabolizables son, por ejemplo, aceites vegetales, tales como aceite de cacahuete y aceite de soja, o aceites animales, tales como el escaleno de aceite de pescado. Como alternativa, puede usarse ventajosamente un solubilizado de vitamina E (tocoferol) tal como se describe en el documento EP 382.271.

60 Las emulsiones de ac./ag. más adecuadas, por ejemplo, se obtienen partiendo de una fase acuosa al 5-50 % p/p y adyuvante oleoso al 95-50 % p/p, más preferentemente se usa una fase acuosa al 20-50 % p/p y un adyuvante oleoso al 80-50 % p/p.

65

La cantidad de adyuvante añadida depende de la naturaleza del adyuvante en sí, y de la información con respecto a dichas cantidades proporcionadas por el fabricante.

5 Aunque es práctica común usar adyuvantes en combinación con vacunas inactivadas, se ha demostrado que varias vacunas vivas también se benefician de la inclusión de un adyuvante. Por lo tanto, esta realización también se encuentra dentro del alcance de la invención.

En una realización preferida adicional, la vacuna de acuerdo con la invención comprende además un estabilizante.

10 Puede añadirse un estabilizante a la vacuna de acuerdo con la invención, por ejemplo, para protegerla frente a la degradación, para potenciar la vida útil, o para mejorar la eficacia de criodesecación. Los estabilizantes útiles son, entre otros, SPGA (Bovarnik et al., 1950, J. Bacteriology, vol. 59, pág. 509), leche desnatada, gelatina, albúmina de suero bovino, carbohidratos, por ejemplo, sorbitol, manitol, trehalosa, almidón, sacarosa, dextrano o glucosa, proteínas, tales como albúmina o caseína o productos de degradación de los mismos, tampones, tales como fosfatos de metal alcalino, y poliaminas, tales como espermina.

También pueden añadirse conservantes, tales como timerosal, mertiolato, o gentamicina.

20 Además, la vacuna puede comprender uno o más tensioactivos o emulsionantes adecuados, por ejemplo, Span® o Tween®.

25 La vacuna también puede comprender lo que se denomina un "vehículo". Un vehículo es un compuesto al que se adhiere el polipéptido o la proteína de acuerdo con la invención, sin estar unido covalentemente a este. Dichos vehículos son, entre otros, biomicrocápsulas, microalginatos, liposomas y macrosoles, todos conocidos en la técnica. Una forma especial de dicho vehículo es un complejo inmunoestimulador (ISCOM).

30 Es obvio señalar que también se encuentra dentro del alcance de la invención la mezcla de otros estabilizantes, transportadores, diluyentes, emulsiones y similares a vacunas de acuerdo con la invención. Dichos aditivos se describen en manuales bien conocidos, tales como: "Remington", y "Veterinary Vaccinology" (ambos citados anteriormente).

35 Es altamente eficaz formular la vacuna de acuerdo con la invención en forma de una vacuna de combinación, ya que de este modo pueden administrarse a la vez múltiples agentes inmunológicos, proporcionando una reducción de los costes de tiempo y trabajo, así como una reducción del malestar para los animales diana vacunados.

40 Dichas vacunas de combinación se logran combinando la vacuna de acuerdo con la invención con otro compuesto antigénico, tal como un virus (vivo o inactivado), bacterias, parásitos, o partes de los mismos, tal como una proteína, un hidrato de carbono, o un ácido nucleico capaz de codificar un antígeno. Ya que la vacuna de acuerdo con la invención está prevista para animales diana aviares, se combina ventajosamente con un antígeno adicional que es, o procede de, otro patógeno para aves de corral.

Por lo tanto, en una realización adicional preferida, la vacuna de acuerdo con la invención comprende al menos un antígeno adicional obtenible de un microorganismo patógeno para las aves de corral.

45 Se conocen muchos patógenos aviares, sin embargo, algunos de los patógenos con mayor relevancia económica-veterinaria son:

- 50 - virus: virus de la bronquitis infecciosa, virus de la enfermedad de Newcastle, gripe aviar, Adenovirus, virus del síndrome de la puesta de huevos, virus de la enfermedad bursal infecciosa (es decir, Gmbovirus), virus de la anemia del pollo, virus de la encefalomiелitis aviar, virus de la viruela aviar, virus de la rinotraqueitis del pavo, virus de la peste de los patos (virus de la enteritis del pato), virus de la viruela de la paloma, enfermedad de Marek, virus de la leucosis aviar, virus de la laringotraqueitis infecciosa, neumovirus aviar, y reovirus;
- 55 - bacterias: *Escherichia coli*, *Salmonella spec.*, *Omitobacterium rhinotracheale*, *Haemophilis paragallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Erysipelas spec.*, *Mycoplasma spec.* y *Clostridium spec.*;
- parásitos: *Eimeria*;
- 60 - hongos: por ejemplo, *Aspergillus*, etc.

También es concebible la combinación en la vacuna de acuerdo con la invención de dos o más Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, por ejemplo, para formar una vacuna de combinación que sea más ampliamente eficaz contra variantes de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención. Los ejemplos de Astrovirus aviares que pueden usarse para formar la vacuna de combinación son los aislados descritos en la tabla 1.

65

Una vacuna de acuerdo con la invención puede adoptar cualquier forma que sea adecuada para su administración a las aves de corral, y que coincida con la ruta de aplicación deseada y con el efecto deseado.

5 La preparación de una vacuna de acuerdo con la invención se lleva a cabo por medios bien conocidos para los expertos en la materia. Preferentemente, la vacuna de acuerdo con la invención se formula en una forma adecuada para inyección, tal como una suspensión, solución, dispersión, emulsión, y similares. Comúnmente, dichas vacunas se preparan estériles.

10 Pueden aplicarse muchos modos de administración, todos conocidos en la técnica. Las vacunas de acuerdo con la invención, cuando están inactivadas, se administran preferentemente mediante inyección; las vacunas vivas, se administran preferentemente mediante un método de aplicación masiva, tal como a través de la alimentación, rociado o del agua de bebida.

15 El protocolo para la administración de la vacuna de acuerdo con la invención está integrado idealmente en calendarios de vacunación existentes de otras vacunas.

La diana preferida para la vacuna de acuerdo con la invención es un animal aviar. Las dianas más preferidas se seleccionan entre el grupo que consiste en pollos, pavos, patos y ocas. La diana más preferida son pollos.

20 La pauta de dosificación para aplicar la vacuna de acuerdo con la invención a un organismo diana puede ser en dosis individuales o múltiples, que pueden administrarse a la vez o secuencialmente, de un modo compatible con la formulación de la vacuna, y en una cantidad tal que será inmunológicamente eficaz.

25 La edad, peso, sexo, estado inmunológico, y otros parámetros de la diana aviar que se va a vacunar no son críticos, aunque es evidentemente favorable vacunar a dianas sanas, y vacunar tan pronto como sea posible para evitar una infección de campo. Por ejemplo, puede vacunarse a las aves de corral en el día de la eclosión, o incluso antes, cuando aún están dentro del huevo, a los 3-4 días antes de eclosionar; por ejemplo, a los 18 días de desarrollo embrionario (ED) para pollos o a los 24 días ED para pavos.

30 Por motivos de estabilidad o economía, puede criodesecarse una vacuna de acuerdo con la invención. En general, esto permitirá el almacenamiento a largo plazo a temperaturas por encima de cero °C, por ejemplo, a 4 °C. Los procedimientos para la criodesecación son conocidos para las personas expertas en la materia, y hay disponible comercialmente equipamiento para la criodesecación a diferentes escalas.

35 Por lo tanto, en una realización preferida, la vacuna de acuerdo con la invención está en una forma criodesecada.

40 Para reconstituir una composición de vacuna criodesecada, se suspende en un diluyente fisiológicamente aceptable. Dicho diluyente puede ser, por ejemplo, tan simple como agua estéril, o una solución fisiológica de sal, tal como suero salino (tamponado con fosfato), o el diluyente ya puede contener un compuesto adyuvante, tal como tocoferol, tal como se describe en el documento EP 382.271. En una forma más compleja, la vacuna criodesecada puede suspenderse en una emulsión, por ejemplo, tal como se describe en el documento EP 1.140.152.

45 Por lo tanto, en una realización preferida adicional, la invención se refiere a una composición de vacuna obtenible mediante reconstitución de una vacuna criodesecada de acuerdo con la invención.

Además de los diversos usos de los compuestos y composiciones de acuerdo con la invención en las vacunas, estos también pueden aplicarse ventajosamente en diagnósticos, para detectar el virus de acuerdo con la invención o sus antígenos o ácidos nucleicos, por ejemplo, en muestras de animales de campo o preparaciones víricas.

50 Esto también se demuestra por los resultados de los experimentos de serotipado mediante ensayo IFT y VN, tal como se describe anteriormente, en los que se aplicaron los antisueros contra los Astrovirus aviares depositados de acuerdo con la invención para discriminar entre virus que se encontraban dentro del alcance de la invención (los aislados descritos en la tabla 1) y aquellos que no (entre muchos otros: ANV1, CAstV2, Reovirus etc.). Igualmente, los experimentos de PCR descritos demostraron la capacidad para identificar de manera selectiva el astrovirus aviar de acuerdo con la invención.

60 Como apreciarán los expertos en la materia, esto no solo se aplica a los anticuerpos de acuerdo con la invención, sino también para los demás compuestos y composiciones de acuerdo con la invención. Dichos ensayos diagnósticos usan por ejemplo los anticuerpos o fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención para ensayar el antígeno; o el uso del antígeno (el virus, la preparación antigénica, o la proteína de acuerdo con la invención) respecto de antígenos contra los mismos; o usar ácido nucleico (ARN del virus, o la molécula de ADN de acuerdo con la invención) para configurar ensayos de hibridación o de PCR.

65 La expresión "kit diagnóstico" implica características relacionadas a un paquete para venta comercial, por ejemplo, que comprende una serie de componentes y artículos desechables para efectuar una prueba diagnóstica y un folleto con instrucciones; todos en una forma de envase comercialmente factible.

Dicho kit diagnóstico comprende, por lo tanto, los materiales necesarios para un ELISA de anticuerpos. En dicha prueba, por ejemplo, se recubren los pocillos de una placa de ELISA con el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, para formar un kit de ELISA de anticuerpo, para la detección de anticuerpos contra el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención o preparaciones o proteínas de los mismos. Tras la incubación con la muestra de ensayo, se añaden a los pocillos anticuerpos marcados reactivos con las inmunoglobulinas de la muestra de ensayo (en caso de que esté presente). Entonces una reacción de color revela la presencia en la muestra de ensayo de anticuerpos específicos.

De manera similar, puede diseñarse un kit de ELISA de antígeno, que comprende, por ejemplo, placas de microtitulación recubiertas con el virus, la preparación antigénica, o la proteína de acuerdo con la invención.

El diseño de dichos inmunoensayos puede variar. Por ejemplo, el inmunoensayo puede basarse en la competición, en lugar de la unión directa. Además, dichas pruebas también pueden usar material en partículas o celular, en lugar del soporte sólido de un dispositivo. La detección del complejo anticuerpo-antígeno formado en la prueba puede implicar el uso de anticuerpos marcados, en el que los marcadores pueden ser, por ejemplo, enzimas o moléculas fluorescentes, quimioluminiscentes, radioactivas o colorantes.

Ventajosamente, las vacunas y diagnósticos tal como se describen en el presente documento pueden usarse ahora en cooperación para diseñar una estrategia para la erradicación del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención en una determinada región o población animal.

Leyenda de las figuras

Figura 1: muestra un alineamiento múltiple de las secuencias de ADNc de una sección de la ORF 1a de un número seleccionado de aislados de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención. Referencia es la secuencia del Aislado 19. La referencia externa es la parte correspondiente de la secuencia de ADNc del genoma de un virus de referencia de ANV1 (SEQ ID NO: 1). El área recuadrada marca la región de 12 nucleótidos, que no está presente en la ORF 1a de ANV1.

Figura 2: muestra un alineamiento múltiple de las supuestas secuencias de aminoácidos, tal como se preparan mediante traducción informatizada de las secuencias de ADNc listadas en la figura 1. El área recuadrada marca los 4 aminoácidos, que no están presentes en la proteína codificada por la ORF 1a de ANV1.

Figura 3: muestra un árbol dendrográfico de los resultados de los alineamientos de secuencias de nucleótidos presentados en la figura 1.

Figura 4: presenta una representación gráfica de las áreas de hibridación de los cebadores de las SEQ ID NO: 30 y 31, en relación a la localización de la región de 12 nucleótidos (representada en negrita) que es única para los Astrovirus aviares de la invención.

Figura 5: muestra una fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, iluminado con luz UV, sobre el que se ejecutó la electroforesis de los productos de un ensayo PCR usando los cebadores de las SEQ ID NO: 30 y 31 en una serie de muestras de ADNc. El producto esperado de una PCR positiva, una banda de aproximadamente 260 pares de bases es claramente visible, solo en el carril 5. Las reacciones RT precedentes se han efectuado con el cebador de SEQ ID NO: 3.

Carril 1: Control negativo (sin ADNc en la reacción PCR)
 Carril 2: Homogenizado de hígado de pollos no infectados
 Carril 3: ANV1; un aislado alemán de 1991, amplificado en 1 x CAM, 4 x saco vitelino, recogido en fluido alantoico.
 Carril 4: CAstV2; procedente del virus depositado en la CNCM con el número CNCM I-2932, fluido alantoico.
 Carril 5: Aislado 19 del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, fluido alantoico.
 M: Carril de marcador de tamaño de ADN: bandas a 200, 400, 600, 800, 1000 pb, etc.

La invención se describirá adicionalmente a continuación con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1: Aislamiento de un Astrovirus aviar de muestras de campo:

Se han aislado muchos aislados de Astrovirus aviares de acuerdo con la invención a partir de pollos y pavos, de diversas granjas en los Países Bajos y Alemania. Como ejemplo típico, en el presente documento se describe en detalle el aislamiento de la muestra n.º 161319 ("Aislado 19").

El Aislado 19 de Astrovirus se aisló a partir de un grupo de tráqueas de 4 gallinas ponedoras de 36 semanas de edad, en una granja holandesa, que presentaban una reducción en el consumo de alimento, reducción en la producción de huevos y un aumento de huevos de segunda calidad. También padecían generalmente indigestión,

diarrea, y problemas de movilidad.

5 Se mezcló tejido agrupado (0,5 - 1,0 g) de tráqueas de los 4 pájaros con aproximadamente 10 ml de "medio de aclarado" (que contiene: 500 ml de HBSS [solución salina básica de Hank] + 2 ml de Bencil penicilina sódica (1.000.000 E.I./ml) + 8 ml de estreptomicina (250 mg/ml) + 0,5 ml de Fungizona (2.000 µg/ml) + 2 ml de NaHCO₃ al 7,5%) y se homogenizaron usando un homogenizador durante 2 minutos. La suspensión se centrifugó durante 15 minutos a 2000 x g a 2 - 8 °C. El sobrenadante se filtró entonces usando un filtro de 450 nm.

10 El fluido resultante se inoculó en la cavidad alantoica de cuatro huevos de pollo SPF embrionados de 8-9 días (1 ml por huevo), la yema de cuatro huevos SPF embrionados de 5-6 días (1 ml por huevo), y la CAM de cuatro huevos SPF embrionados de 9 días (0,5 ml por huevo) y se incubaron a de 36,5 a 38,5 °C con una humedad del 40 al 55 %. Los huevos se inspeccionaron a trasluz a diario. La muerte embrionaria sucedida tras un día de inoculación se consideró no específica.

15 Los embriones de los huevos inoculados en el saco vitelino no mostraron anomalías a los 7 días p.i. Sin embargo, se recogió fluido vitelino y se usó para un segundo pase.

20 Se mezclaron cuatro ml del fluido vitelino recogido del primer pase (1 ml por huevo) con 0,5 ml de "medio de pase" (que contiene: 90 ml de HBSS + 2 ml de bencil penicilina sódica (1.000.000 I.E./ml) + 8 ml de estreptomicina (250 mg/ml) + 0,5 ml de fungizona (2.000 pg/ml) + 2 ml de NaHCO₃ al 7,5%). A partir de esta mezcla se inoculó 1 ml por huevo en la yema de cinco huevos SPF embrionados de 5 días y se incubaron a de 36,5 a 38,5 °C con una humedad del 40 al 55 %. Los huevos se inspeccionaron a trasluz a diario.

25 En el sexto día después de la inoculación, un embrión había muerto y mostró enrojecimiento en el cuerpo. Se ensayó el fluido alantoico de este huevo respecto de Reovirus en un ensayo de precipitación en gel de agar (AGP); fue negativo para Reovirus.

30 Se recogieron aproximadamente de 4 a 5 ml de la yema de este huevo con embrión anormal y se usó para pases adicionales, del mismo modo que el segundo pase.

35 En el tercer pase, en el quinto día después de la inoculación, tres embriones habían muerto y dos de ellos mostraron enrojecimiento en el cuerpo. El fluido alantoico agrupado fue negativo en el AGP para Reovirus, y para Adenovirus de tipo 1.

40 En pases posteriores, aumentó el título del aislado, ya que los embriones murieron o mostraron síntomas más temprano tras la inoculación. En el 6º y 7º pase la coloración roja brillante típica de las patas y las puntas de las alas se hizo evidente.

45 De manera consistente, el fluido alantoico fue negativo en pruebas de HA o AGP para IBDV, Reovirus, Adenovirus, NDV, AIV e IBV. Asimismo, un ensayo PCR para IBDV fue negativo.

Los fluidos CAM y alantoico recogidos se almacenaron congelados a -80 °C, y se usaron para caracterización adicional.

45 Ejemplo 2: Aislamiento de ARN vírico:

50 Para el aislamiento del ARN vírico total, se usó un kit QIAamp® Viral RNA mini (QiaGen™), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen: se mezclaron 140 µl de fluido que contenía virus, tal como fluido alantoico, o un homogenizado de tejido o de embrión (normalmente en cantidades de entre el 5 - 50% p/v), con tampón de extracción preparado previamente y ARN portador. Esto se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. A continuación se añadió etanol puro (96 - 100 %), se mezcló, y la mezcla se aplicó a una columna QIAamp Mini spin (en un tubo de recolección de 2 ml). Esto se centrifugó durante 1 min a 6000 x g. Se desechó el flujo pasante. La columna se lavó con tampón de lavado que contenía etanol puro. Finalmente, la columna se eluyó con 60 µl de tampón de elución. Comúnmente, el aislamiento de ARN fue seguido directamente de la producción de ADNc mediante una reacción de RT.

La presencia de ARN astrovírico se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa/formamida convencional de ARN.

60 Ejemplo 3: Producción de ADNc mediante reacción de RT:

65 La síntesis de la primera hebra de ADNc se efectuó usando perlas de primera hebra Ready-To-GO® You-Prime de Amersham-Pharmacia™, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen: 29 µl del ARN eluido a partir del aislamiento del ARN vírico total se desnaturalizó durante 10 minutos a 65 °C, y 2 minutos sobre hielo. Esto se añadió a un tubo que contenía dos perlas, y se añadieron 4 µl de cebador 17 10 µM (SEQ ID NO: 3), hasta un volumen final de 33 µl. Esto se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente, se mezcló cuidadosamente

pipeteando, y se incubó durante 1 hora a 37 °C. El ADNc se almacenó congelado a menos de -20 °C hasta su uso posterior.

Ejemplo 4: Reacciones PCR:

5 La PCR se usó para preparar ADN bicatenario (bc) a partir de ADNc de la reacción de RT. Asimismo, la PCR se usó como un ensayo de detección de tipo diagnóstico para identificar específicamente si los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención estaban presentes en una muestra.

10 Los ingredientes de la reacción PCR fueron de HT Biotechnology™ Ltd.: tampón Supertaq® (concentrado a 10 x) usado a una concentración 1x; enzima polimerasa Supertaq® Plus (5 U/μl) usada a 1 U/μl, y dNTP premezclados (10 mM), usados a 2 mM. Estos se mezclaron en agua destilada libre de RNasa.

15 Los cebadores usados fueron aquellos usados según se listan en la tabla 4. Los cebadores se sintetizaron por Invitrogen™, Países Bajos, y la solución madre de tampón se efectuó en tampón TE (pH 8,0) a 100 μM; la solución madre de trabajo estaba a una dilución de 10 μM para su uso directo.

20 Para una PCR estándar, se usaron los siguientes ingredientes: 27 μl de agua destilada, 5 μl de tampón Supertaq Plus 10x; 1 μl (igual a 1 unidad) de enzima Supertaq Plus; 5 μl de mezcla de dNTP 2Mm; 5 μl de cada uno del cebador directo e inverso (a 10 μM); y finalmente 2 μl de ADNc de la mezcla de reacción de RT; alcanzando un volumen total de 50 μl.

25 Las condiciones de reacción típicas, por ejemplo, para amplificar la ORF 1a con los cebadores F-II y R-II-3 (SEQ ID NO: 28, 29), o la ORF 1b usando los cebadores 20 y 21 (SEQ ID NO: 32, 33) fueron:

- 1 min a 95 °C,
- 40 ciclos de: 30 s a 94 °C; 1 min a 48 °C; y 40 s a 72 °C,
- 10 min a 72 °C
- retención a 20 °C.

30 NB: todas las temperaturas PCR son ± aproximadamente 1 °C.

35 Durante las optimizaciones, se aplicaron algunas variaciones: 45 en lugar de 40 ciclos, y variaciones de la temperatura de hibridación y tiempo en la etapa de ciclado: se usaron temperaturas entre 46 y 53 °C, a duraciones de 30 s o 1 minuto.

40 Para la detección específica de los Astrovirus aviares de acuerdo con la invención, usando los cebadores 29 y 30 (SEQ ID NO: 30, 31) las condiciones óptimas usadas para la fase de ciclado fueron: 45 ciclos, con una etapa de hibridación de 30 s a 51 °C. Otras condiciones fueron como para la reacción de los cebadores 20/21.

45 Las reacciones PCR para las reacciones de ciclo de secuenciación tuvieron una configuración esencialmente diferente: 25 ciclos de: 10 s a 96 °C; 5 s a 50 °C; y 2 min a 60 °C, véase más adelante.

Ejemplo 5: Análisis de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa, purificación y subclonación:

50 Se usó electroforesis en gel de agarosa para la detección y visualización de los productos de la PCR producidos. Esto sirvió también para purificar productos PCR mediante escisión y extracción, permitiendo la secuenciación o subclonación de estos productos aislados de la PCR.

55 En resumen, se prepararon geles de agarosa al 0,8 % (del tipo de baja electro-endoosmosis) en tampón TAE (pH 8,0), que contenía aproximadamente 50 μl de una solución de bromuro de etidio a 0,5 mg/ml por 100 ml de solución de agarosa. Se mezcló una muestra del producto de la PCR a 1:10 con tampón de carga de muestra convencional (glicerol/SDS/azul de bromofenol). Típicamente se incluyó un carril de marcador usando SmartLadder® de Eurogentec™ Electrophoresis, sumergido en tampón TAE, llevada a cabo normalmente durante 1 hora a 100 V para un gel de 20 x 20 x 1 cm, o hasta que el colorante azul alcanza el extremo del agar. La visualización fue mediante luz UV. Los geles se fotografiaron con una cámara digital.

60 La electroforesis en gel de agar se usó también para estimar la concentración de ADN de una banda cortada y purificada; en ese caso se corrió una muestra junto con una serie de carriles que portaban diferentes cantidades de la escala de marcador de ADN.

65 La purificación de bandas específicas de productos de la PCR de un gel de agarosa se efectuó usando el kit de extracción de gel QIAquick® (QiaGen™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando bien una microcentrifugadora o el colector de vacío QIAvac®.

Las bandas de ADN cortadas y purificadas a partir de un gel de agarosa se subclonaron en plásmidos bacterianos para su uso posterior, tal como ensayos de clonación, secuenciación, expresión o de detección de la hibridación. Los fragmentos de ADN se clonaron en el plásmido pCR2.1 usando un vector TOPO-TA® y el kit de clonación TOPO-TA® (Invitrogen™), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5 Ejemplo 6: Secuenciación de ADN:

La secuenciación de ADN se llevó a cabo mediante secuenciación de ciclo de PCR convencional, usando una mezcla de reacción Big Dye® Terminator Ready (ABI Prism™), y un aparato de secuenciación automatizada ABI Prism™ 310, todo de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Típicamente, se usaron de 20 a 70 ng de ADN (producto de la PCR purificado, o fragmento clonado en un vector) en una reacción de secuenciación, con 8 µl de mezcla de reacción Big Dye® Terminator Ready, 1 µl de cebador 10 µM, en agua destilada hasta un volumen total de 20 µl. Los cebadores usados para la secuenciación fueron normalmente los mismos que aquellos usados en la PCR para preparar el producto de ADN bc a partir del ADNc.

La PCR de ciclo de secuenciación fue mediante 25 ciclos de: 10 s a 96 °C, 5 s a 50 °C, y 2 min a 60 °C.

Tras la PCR, las muestras se purificaron usando columnas de centrifugación DyeEx® (QiaGen™), para la eliminación del colorante-terminador, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, usando tubos Eppendorf® y una microcentrifugadora. El eluato final se resuspendió a 1:2 hasta un volumen total de 40 µl con agua destilada.

La determinación de la secuencia se efectuó entonces mediante análisis en un analizador genético ABI Prism® 310, con el programa informático Data Collection versión 1.0.4 y Sequence Analysis versión 3.

El análisis de secuencia se efectuó usando una serie de programas, los más usados fueron Sequencher® (Gene Codes™), y Clone Manager® (Sci. Ed. Software™). Las secuencias iniciales y finales se recortaron para eliminar lecturas de nucleótidos que se introdujeron basándose en los cebadores de la PCR desnaturalizados que se habían usado.

Las secuencias de ADN presentadas en el presente documento en las SEQ ID NO. 4 - 26 (números pares), son las secuencias consenso derivadas de múltiples reacciones de secuenciación. La mayor parte de las veces las secuencias se leyeron también a partir de ambas hebras, usando cebadores de secuenciación directos e inversos; únicamente la SEQ ID NO: 8 se determinó a partir de solo una hebra. La redundancia media fue de aproximadamente 4x por nucleótido.

Ejemplo 7: Titulación de Astrovirus en huevos de pollo embrionados

Se inocularon diluciones en serie de factor diez de suspensión de Astrovirus en el saco vitelino de huevos de pollo SPF embrionados de seis días de edad usando una aguja 23G de 1". Posteriormente, los huevos se incubaron durante siete días a 37 °C en una incubadora de huevos.

Los huevos se inspeccionaron a trasluz a diario. La mortalidad que sucedía a las 24 horas después de la inoculación se consideró no específica y por lo tanto, dichos huevos que contenían embriones muertos de manera temprana se descartaron y excluyeron del cálculo del título de infectividad.

Los embriones que morían desde los días 2 hasta 7 después de la inoculación se inspeccionaron respecto de la presencia de lesiones características para la infección con el Astrovirus de acuerdo con la invención; este fue el caso si los embriones muertos mostraban patas y puntas de las alas de color rojo brillante, e hígado inflamado de color rojo oscuro. El título de infectividad se calculó usando un programa informático basado en el método de Spearman y Karber y se expresó en DLE50 por ml.

Ejemplo 8: Producción de Astrovirus en huevos de pollo embrionados

Los huevos de pollo SPF embrionados de nueve días de edad se inocularon con 10⁵ DLE50 de Astrovirus en el saco vitelino usando una aguja de 22G de 1½". Posteriormente, los huevos se incubaron a 37 °C en una incubadora de huevos.

Tras 24 horas de incubación, los huevos se inspeccionaron a trasluz. La muerte sucedida tras las 24 horas se consideró no específica, descartándose estos huevos.

Tras 48 de incubación, se recogió el fluido alantoico de todos los huevos restantes. El fluido se almacenó congelado a -60 °C.

El título de infectividad se estableció mediante titulación en huevos de pollo embrionados o en células tal como se describe anteriormente.

Ejemplo 9: Producción de células primarias:

Las células CEL se prepararon a partir de huevos de pollo SPF embrionados de 14-16 días de edad, aislando el hígado del embrión. El hígado se lavó con PBS/rojo de fenol, y se incubó durante 8-10 minutos a temperatura ambiente en una solución que contenía tripsina en PBS. El sobrenadante se recoge a través de una gasa de 100 µm. Esto se repite dos veces más, a continuación se recogen las células mediante centrifugación en un medio de cultivo rico adecuado que contenía suero de ternero fetal (FCS) al 5 %.

Las células CEK se prepararon de manera similar, usando los riñones de embriones de pollo SPF de aproximadamente 18 días de edad. Los riñones se diseccionaron cuidadosamente, se lavaron, y se tripsinizaron una vez, durante 20 minutos a temperatura ambiente. A continuación, las células CEK se filtraron y se recogieron en medio de cultivo +FCS.

Ejemplo 10: ensayo IFT:

Se usaron ensayos de inmunofluorescencia (IFG) para investigar la especificidad interespecífica de determinados antisueros, así como para la titulación vírica. Normalmente, los IFT se llevaron a cabo en células primarias en placas de microtitulación.

Cuando se usaron células CEK para un IFT, estas se sembraron a 10^5 células/100 µl en los pocillos de placas de microtitulación de 96 pocillos. Las células estaban en un medio de cultivo rico convencional, con FCS al 2 % y antibióticos, y se incubaron a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5 %. Al día siguiente, se inoculó el virus a las células.

Con fines de titulación, se usaron diluciones en serie de los virus. Las placas se incubaron entonces durante 2 días adicionales. Entonces, se retiró el sobrenadante, y las células se fijaron con etanol puro a -70 °C. Las placas se pudieron almacenar a -20 °C hasta su uso. Para visualizar el virus para la titulación, las placas se tñieron con antisuero específico. Por lo tanto, las placas se adaptaron a temperatura ambiente, se retiró el alcohol y las placas se lavaron con PBS. Se preparó una dilución de suero anti-Astrovirus a una fuerza que se sabía que proporcionaba buena fluorescencia, pero no demasiado fondo. El primer antisuero se dispuso sobre las placas y se incubó durante 1 hora a 37 °C en una atmósfera humedecida. Entonces se lavaron las placas 3x con PBS. Después se preparó el segundo conjugado de anticuerpo, un conjugado de IgG de cabra anti-pollo- FITC (Nordic™). Este se dispuso sobre las placas a la dilución requerida, y se incubó de nuevo durante 1 hora a 37 °C. Tras esta incubación se lavaron de nuevo las placas 3x con PBS, tras lo cual se añadió una mezcla 1:1 de PBS:glicerol. Entonces se almacenaron las placas en la oscuridad a 4 °C hasta su lectura mediante un microscopio de fluorescencia. Una señal positiva es la detección de fluorescencia específica, que se correlaciona con signos de cpe en la capa celular.

Para la caracterización de suero, y las pruebas de reactividad cruzada entre especies, se prepararon placas de microtitulación de un modo similar, usando células CEK o CEL. Al día siguiente estas se infectaron con los diferentes virus que se iban a ensayar, por ejemplo, aislados de astrovirus de acuerdo con la invención, pero también ANV1, y CAstV2, así como otros patógenos aviares: Reovirus, IBV, NDV, FPV, Adenovirus, AIV, etc. La cantidad de virus fue una cantidad fija o una dilución, según fuese conveniente. Las placas se incubaron durante 2-3 días.

Para probar la capacidad de un determinado antisuero para unirse a diferentes virus, el suero se incubó en las placas, y la señal se potenció mediante incubación con conjugado. Para la optimización de la señal de unión frente al fondo, se ensayó una serie de diluciones de los antisueros en PBS en diferentes diluciones de los diversos virus.

Ejemplo 11: Infección de pollos con Astrovirus

Se ensayó el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención en pollos en una configuración experimental para reproducir los síntomas de enfermedad observados en el campo, y para volver a aislar el microorganismo a partir de estos animales secundarios infectados. Esto sirvió para cumplir con los postulados de Koch para establecer que el aislado ensayado es un microorganismo patógeno y virulento y agente infeccioso causante de los síntomas observados en el campo.

Asimismo, se infectó a pollos repetidamente para ensayar la eficacia de la vacunación por un inóculo vivo, frente a infecciones de exposición posteriores.

Finalmente, el suero total se aisló de pollos infectados experimentalmente para obtener antisuero policlonal específico contra el Astrovirus inoculado.

Con este fin, se transfirieron pollos SPF de tipo ponedor, de raza Leghorn blanca de ambos sexos a un aislador de presión negativa a las tres semanas de edad. Los animales se asignaron a grupos de tratamiento mediante selección aleatoria, y se marcaron individualmente por medio de bandas dobles en las alas. Se les proporcionó alimento convencional y agua para bebida a voluntad.

Se tomaron muestras de sangre a intervalos regulares a lo largo del experimento, también en el día cero, para determinar el estado inmunológico. A continuación se inoculó a 15 pollos a través de tres rutas: con 0,2 ml cada uno por la ruta ocular e intramuscular, así como con 0,5 ml por ruta oral, a 10^5 DIE50/dosis de 0,2 ml, y a $10^{5,4}$ DIE50/dosis de 0,5 ml. El inóculo fue el Astrovirus de Aislado 19 depositado, resuspendido en agua para inyección. 5 pollos, colocados en el mismo aislador no fueron inoculados para servir como controles, y como centinelas. Los animales fueron inspeccionados diariamente respecto de signos clínicos de enfermedad o mortalidad.

A los 20 días después de la inoculación (p.i.), se desangró a un número de pollos y se les remitió para examen histopatológico *post mortem*. En el día 23 p.i. los demás pollos (previamente inoculados) recibieron un refuerzo con una dosis similar de inóculo. Tras otros 23 días, el experimento terminó, se desangró a los animales vivos y fueron examinados.

Algunas aves no fueron inoculadas inicialmente, pero se alojaron en los mismos aisladores que las aves inoculadas/infectadas; tal como se esperaba, estas aves se infectaron mediante difusión horizontal del Astrovirus.

Ejemplo 11a: Resultados de histopatología:

Los resultados histopatológicos de los ensayos con animales fueron los siguientes: 2 pollos habían muerto, y 5 animales, de los cuales 3 eran controles tenían diarrea. Tras la histopatología, varios animales mostraron una patología más o menos grave en el riñón y el tracto intestinal ya desde el día 7 p.i. Los riñones presentaron una nefritis intersticial grave, y degeneración tubular como signos más destacados. El timo y la bursa mostraron linfocitosis; el páncreas mostró apoptosis y atrofia acinar; y el duodeno mostró vellos romos y fusionados.

La infección horizontal de los pollos de control no inoculados demostró la virulencia e infectividad del inóculo de Astrovirus.

Ejemplo 11b: Resultados de la PCR:

Se ensayaron muestras de riñón de todos los pollos mediante PCR respecto de señales del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención. Tras la homogenización, y aislamiento de ARN, se prepararon muestras para RT. Estas se ensayaron mediante PCR con los cebadores de las SEQ ID NO: 30 y 31. Todas las muestras de los animales infectados fueron positivas en los ensayos, al presentar la banda de 260 pb específica que identifica al Astrovirus aviar de acuerdo con la invención. Se incluyeron controles positivos y negativos adecuados.

Esto demostró que el agente causante de la mortalidad y signos histopatológicos fue el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención. Los síntomas observados, nefritis y diarrea, coincidieron con aquellos observados en el campo. Los problemas con las patas no pudieron reproducirse; lo más probablemente, los pájaros usados tenían una complexión demasiado delgada como para mostrar dichos problemas, y/o las condiciones de los pollos SPF en un aislador no imitaron suficientemente la presión infectiva múltiple que experimenta un pájaro en el campo.

Ejemplo 11c: Resultados de VN:

Se incubaron cantidades fijas de aislado 19 de Astrovirus con antisueros de pollo del día 0, día 20 y día 46 p.i., durante 1 hora a 37 °C. Estas muestras de virus se inocularon entonces en huevos SPF embrionados de 6 días de edad, y se incubaron durante varios días. A los 4 días después de la inoculación del huevo, los embriones que recibieron virus tratados con suero del día 0 habían muerto, y mostraron signos típicos de infección por el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención.

Sin embargo, los virus incubados con suero tomado el día 20, o suero del día 46 no afectaron a los embriones. Esto demuestra que el virus del aislado 19 puede neutralizarse de manera eficaz mediante un antisuero de pollo específico.

Esto también demuestra que pueden inducirse antisueros eficaces con capacidad VN en pollos tras la inoculación con el Astrovirus aviar vivo de acuerdo con la invención.

Ejemplo 11d: Resultados de IFT:

Los resultados de ensayos IFT de reacción cruzada usando los antisueros de pollo policlonales demostraron que un antisuero anti-aislado 19 no reconoció cualquier virus distinto de los aislados de virus del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención.

De manera similar, los antisueros específicos para ANV1 o para CAstV2 igualmente solo reconocieron al virus específico contra el que se habían generado. Igualmente importante fue que ni el suero anti-ANV1 ni el anti-ChAstV2 se unieron a un aislado de virus del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención. Esto se aplica incluso con las cantidades de anticuerpo más altas ensayadas (las muestras menos diluidas).

Asimismo, ninguno de los antisueros contra otros patógenos aviarios, de manera más relevante Reovirus, pudo unirse a los aislados de virus del Astrovirus aviar de acuerdo con la invención, o viceversa.

5 Esto demostró que el Astrovirus aviar de acuerdo con la invención es un serogrupo nuevo y único por sí mismo, lo que confirmó por lo tanto las diferencias moleculares biológicas únicas identificadas.

Las placas con células CEK se infectaron con Astrovirus de aislado 19, 3^{er} pase, en diluciones en serie de factor 10 del virus. Tras dos días, las placas se fijaron y tiñeron con diferentes antisueros:

- 10 - suero anti-aislado 19 agrupado del día 33 después de la inoculación, 1:20 en PBS,
 - anti ANV1 (cepa SE-027/2), generado en pollos; 1: 20 en PBS (el ANV1 es un aislado de ANV1 alemán, que tras la secuenciación de ADN de regiones específicas, pareció estar más estrechamente relacionado con la secuencia de ANV1 de referencia de GenBank, que se usa en el presente documento).
 15 - anti CAstV2 (cepa TS9L), generado en pollos, 1: 500 en PBS (el CAstV1 derivó de la muestra que se había depositado en la CNCM en París, Francia, con el número de depósito I-2932).
 - control negativo, solo PBS.

Después de conjugación con IgG de cabra anti-pollo, se leyeron las placas:

Virus → ↓ Antisuero	Aislado 19	ANV1	CAstV2	Células CEK negativas
anti-aislado 19	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
anti-ANV1	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
anti-CAstV2	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

20

Ejemplo 12: Ensayos de vacunación adicionales

Vacuna inactivada:

25 Se vacunarán pavos y pollos con una vacuna adyuvada de Astrovirus inactivado de acuerdo con la invención, para optimizar la dosis de antígeno.

30 El Astrovirus de aislado 19 se cultivó en CEL, tal como se ha descrito, y se inactiva usando beta-propiolactona (BPL) bajo el control de temperatura y pH, de acuerdo con protocolos convencionales. El Astrovirus inactivado se homogeniza en una emulsión de ag./ac. convencional que consiste en un aceite mineral ligero y emulsionantes adecuados, usando protocolos estándar.

35 Los pavos y pollos se alojarán en unidades aisladas: se asignarán 120 pavos comunes de dos semanas de edad a 6 grupos separados (grupo 1 - 6) según lleguen de tal forma que cada grupo contiene 20 animales. A las tres semanas de edad, se vacunará a los pavos en los grupos 1 - 4 por ruta intramuscular con la vacuna de emulsión de ag./ac., que contiene aislado 19 de Astrovirus inactivado. Los pavos en el grupo 5 se vacunarán por ruta subcutánea con la misma vacuna de emulsión de ag./ac. y los pavos en el grupo 6 no se vacunarán para servir como controles.

40 De manera similar, se asignarán 180 pollos ponedores SPF de un día de edad a 9 grupos separados (grupos 7 - 15) según lleguen de tal forma que cada grupo contiene 20 pollos. A las tres semanas de edad, se vacunará a los pollos en los grupos 7 - 10 por ruta intramuscular con una vacuna de emulsión de ag./ac., que contiene Astrovirus de tipo 3. Los pollos en los grupos 11 - 14 se vacunarán con la misma vacuna por la ruta subcutánea y los pollos en el grupo 15 no se vacunarán para servir como controles.

45 Antes del comienzo del experimento, y a las 4, 8, y 12 semanas después de la vacunación se extraerán muestras de sangre de todos los pavos y pollos. Los sueros se examinarán respecto de la presencia de anticuerpos específicos para los Astrovirus de acuerdo con la invención y sus títulos, mediante IFT en células CEL, o mediante ensayo VN.

50 Este protocolo puede modificarse fácilmente para incluir un estudio de duración de la inmunidad en caso de que sea relevante, por ejemplo, manteniendo a las aves vacunadas en aisladores durante 6 - 12 meses adicionales y después aplicando una infección de exposición con un Astrovirus de acuerdo con la invención.

Vacuna viva:

Se vacunará a pollos con una dosis de Astrovirus vivo de acuerdo con la invención, y posteriormente se les expondrá a Astrovirus, para optimizar la ruta de aplicación para una vacuna de Astrovirus vivo.

- 5
- Se asignará a 100 pollos de engorde comerciales MDA+ (positivos a anticuerpos procedentes de la madre) de un día de edad a 5 grupos separados de tal forma que cada grupo contiene 20 pollos. A la edad de un día, se vacunará a los pollos en los grupos 1 - 4 con aislado 19 de Astrovirus vivo de fluido alantoico, mediante gotas oculares, rociado grueso, rociado de aerosol, o agua de bebida. Los pollos en el grupo 5 no serán inoculados para servir como
- 10
- controles no vacunados. A las 4 semanas después de la vacunación se expondrá a todos los pollos a un Astrovirus de acuerdo con la invención. Durante las tres semanas después de la exposición se observará a todos los pollos diariamente respecto de la aparición de signos clínicos de infección por Astrovirus y/o mortalidad. Veintiún días después de la exposición se sacrificará todos los pollos restantes, y se les someterá a examen histopatológico.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Astrovirus aviar que tiene una región genómica de fase de lectura abierta (ORF) 1a, caracterizada por que la ORF 1a de dicho Astrovirus aviar, cuando se compara con la ORF 1a del virus de la nefritis aviar 1, contiene una inserción de 12 nucleótidos, estando localizada dicha inserción entre los nucleótidos correspondientes a los nucleótidos numerados 2485 y 2486 de la SEQ ID NO: 1.
- 10 2. Astrovirus aviar de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la inserción de 12 nucleótidos tiene una secuencia de ácido nucleico como la presentada en la SEQ ID NO: 2.
- 15 3. Astrovirus aviar de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 2, **caracterizado por que** la ORF 1a de dicho Astrovirus aviar comprende una región que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 88 % con la SEQ ID NO: 4.
- 20 4. Astrovirus aviar de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 3, **caracterizado por que** puede producirse un producto de PCR de aproximadamente 260 nucleótidos a partir de la ORF 1a de dicho Astrovirus aviar en un ensayo de PCR que usa un conjunto de cebadores representados en las SEQ ID NO: 30 y 31.
- 25 5. Astrovirus aviar de acuerdo con las reivindicaciones 1 - 4, que es un virus como el depositado con el número CNCM I-3895 en la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM), del Institut Pasteur en París, Francia.
- 30 6. Un anticuerpo o un fragmento del mismo que puede neutralizar al Astrovirus aviar de la reivindicación 5, en un ensayo de neutralización de virus.
- 35 7. Preparación antigénica obtenible a partir del Astrovirus aviar de acuerdo con la reivindicación 5, en el que el Astrovirus aviar está en forma inactivada.
- 40 8. Una molécula de ADN que comprende una región que tiene una identidad de secuencia de nucleótidos de al menos el 88 % con la SEQ ID NO: 4.
- 45 9. Una proteína que comprende una región que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 93 % con la SEQ ID NO: 5.
- 50 10. Una vacuna que comprende al Astrovirus aviar de acuerdo con la reivindicación 5, el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 6, la preparación antigénica de acuerdo con la reivindicación 7 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
11. Vacuna de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende al menos un antígeno adicional obtenible de un microorganismo patógeno para las aves de corral.
12. Compuesto o composición para su uso en una vacuna para aves de corral, en donde el compuesto o la composición son el Astrovirus aviar de acuerdo con la reivindicación 5, el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 6 o la preparación antigénica de acuerdo con la reivindicación 7.
13. Uso de un compuesto o de una composición para la fabricación de una vacuna para aves de corral, en donde el compuesto o la composición son el Astrovirus aviar de acuerdo con la reivindicación 5, el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 6 o la preparación antigénica de acuerdo con la reivindicación 7.
14. Método para la fabricación de una vacuna para aves de corral, en el que un compuesto o la composición se mezclan con un vehículo farmacéutico adecuado, y en el que el compuesto o la composición son el Astrovirus aviar de acuerdo con la reivindicación 5, el anticuerpo o el fragmento del mismo de acuerdo con la reivindicación 6 o la preparación antigénica de acuerdo con la reivindicación 7.

Figura 1

```

Aislado 19-Orfla      1 ACTAAATCGATCTCAAAAGCTGCCTTCATGAAAACAAAAGTCCTTACCGAAGAAGAATAC
637-Orfla            1 .....A.....T.....C.....T
686-Orfla            1 .....A.....T.....C.....G..T
714-Orfla            1 .....A.....T.....C.....G....T
715-Orfla            1 .....
1736-Orfla           1 ..C.....A.....T....T..C.....T
2383-Orfla           1 .....C.....A.....T....T..C.....T
2388-Orfla           1 .....T..G.....T....T..C.....T
7279-Orfla           1 ..C..G.....C.....T....T....T.....T
161317-Orfla         1 .....A.....T.....C.....T
ANV1-Orfla           2213 ..C...G.....T..G.....T.....C.....T
    
```

```

Aislado 19-Orfla      61 CGTCGGTTAGAGGAAGAAGGCTTCTCAAAGATGAGATTAAAGAGATCGTGGACAATCTG
637-Orfla            61 .....G....G.....T..T.....C.....T.....T
686-Orfla            61 .....G....G.....T..T.....C.....T.....T
714-Orfla            61 .....G.....T..C.....C.....T.....T
715-Orfla            61 .....
1736-Orfla           61 .....G.....T....G.....C.....T.....C
2383-Orfla           61 .....G.....T.....C.....T.....C
2388-Orfla           61 .....G.....T.....C.G.....T.....C
7279-Orfla           61 .....G.....T..T.....C.....T.....T
161317-Orfla         61 .....G....G.....T..T.....C.....T.....T
ANV1-Orfla           2273 ..C.....G.....A.T.....C..G..C.....T.....C
    
```

```

Aislado 19-Orfla      121 CGAGAACAAGCCTGGATCGATTACCAGAATCAGCTAGATGAAGAAGGTGATGATGACTGG
637-Orfla            121 ..T..G..G.....T.....T....C..A..T.....G.....
686-Orfla            121 ..T..G....T....T..C..T....C..A..T.....G....C.....
714-Orfla            121 ..T..G..G..T....T..C..T....C..A..T.....G.....
715-Orfla            121 .....C.....
1736-Orfla           121 ..T.....T....T..C.....C..A..T.....
2383-Orfla           121 ..C.....T..C.....C..A..T.....
2388-Orfla           121 ..C.....T..C.....T.....C.....
7279-Orfla           121 ..C..G..G.....T.....C..A..T.....G.....
161317-Orfla         121 ..T..G..G....T..C..T....C..A..T..C....G....C....T...
ANV1-Orfla           2333 A....G..G..G...C...C..T....C..A..T.....
    
```

```

Aislado 19-Orfla      181 TATGAGCAAATGACTGAAGATCAAAGAATTAATGATGAGATTGATAAGCAAATTGAGCAA
637-Orfla            181 .....G..C.....A....C.....
686-Orfla            181 .....G.....C..A....C....G..C.....
714-Orfla            181 .....A.....G.....G..C.....A.....
715-Orfla            181 .....C.....
1736-Orfla           181 .....A.....G..C.....A....C....G....A...
2383-Orfla           181 .....A.....C....G..C.....A.....GG
2388-Orfla           181 .....G..C.....A.....G.....G
7279-Orfla           181 .....A.....G..C.....A....C..A.....A...
161317-Orfla         181 .....G..C.....A....C.....
ANV1-Orfla           2393 ..C..A.....GAA..G.....C..A....CC.AA.C....AAG.
    
```

ES 2 567 712 T3

Aislado19-Orfla	241	GACCTTGAAGATCGAGGAGAATGGTATGGCCAG	TCTGGGAAACCT	AGGAGGATAACCTTT
637-Orfla	241T.....AC....C
686-Orfla	241	..T.....C.....T.....AC....C
714-Orfla	241C.....T.....	..C..TC....C
715-Orfla	241T..
1736-Orfla	241	..T.....G.....C.....TC....
2383-Orfla	241	..T.....T.....G.....T...A...T..A.....C
2388-Orfla	241	AGT.....T..C..C.....A..G...A.....C
7279-Orfla	241	..T.....T..C.....TC....T...
161317-Orfla	241T.....AC....C
ANV1-Orfla	2453C..G..A...T.....T...	-----AA.....C

Aislado19-Orfla	301	AAACAGAGAGCGATGCTTCGCTTCATTCAGCTTGGTCGACAACAACAATAGCCACAATT
637-Orfla	301	..G..A..G.....A....C..A.....C.....
686-Orfla	301A..G.....T....C..A.....G.....C.....
714-Orfla	301	..G.....T.....T..C..A.....G.....C.....
715-Orfla	301	..G.....G.....
1736-Orfla	301	..G.....A....G.....C...T.....
2383-Orfla	301	..GG.A.....T.....G.....T.CG....T..C
2388-Orfla	301	..GG.A.....A..C..GA.....
7279-Orfla	301	..G....G..A.....C..G.....CG.....
161317-Orfla	301	..G..A..G.....A....C..A.....C.....
ANV1-Orfla	2501	..G..A.....T.....A....C..G.....GG.G....TG.C

Aislado19-Orfla	361	TCATTTCTGATGGCTATGAAGATAGAGCTGAAGAACTCTATAATAA
637-Orfla	361G.....T.....
686-Orfla	361G..G...T...C..
714-Orfla	361G.....
715-Orfla	361
1736-Orfla	361	...C.....T.....T.T...C..
2383-Orfla	361C..A....T.....T.....
2388-Orfla	361C....T.G.....A...T...C..
7279-Orfla	361T.....TC..C..
161317-Orfla	361G.....T.....
ANV1-Orfla	2561T....G..C.....C.....

Figura 2

Aislado19	1	TKSISKAAFMTKVLTEEEYRRLEEEGFSKDEIKEIVDNLREQAWIDYQ
637	1
686	1
714	1
715	1
1736	1
2383	1
2388	1R.....
7279	1	..A.....
161317	1
ANV1	1	..A.....T.....D.....L...

Aislado19	50	NQLDEEGDDWYEQMTEDQRINDEIDKQIEQDLEDRGEWYQ	SGKP	R
637	50D.....	..Q.	.
686	50D.....	..Q.	.
714	50D.....	..Q.	.
715	50S	.
1736	50D.....	..Q.	.
2383	50V.....R.....	...L	.
2388	50V.....R.....S.....D.....
7279	50D.....	..Q.	.
161317	50D.....	..Q.	.
ANV1	50E.....Q..QN..R.....	----	.

Aislado19	97	RITFKQRAMLRFIQLGRQQIATISFPDGYEDRAEELYN
637	97T.....F.
686	97T.....F.
714	97T.....
715	97
1736	97T.....L.....F.
2383	97	...E.....HT.....F.
2388	97	...E.....C.....IF.
7279	97T.....F.
161317	97T.....F.
ANV1	95	K.....V..V.....

Figura 3

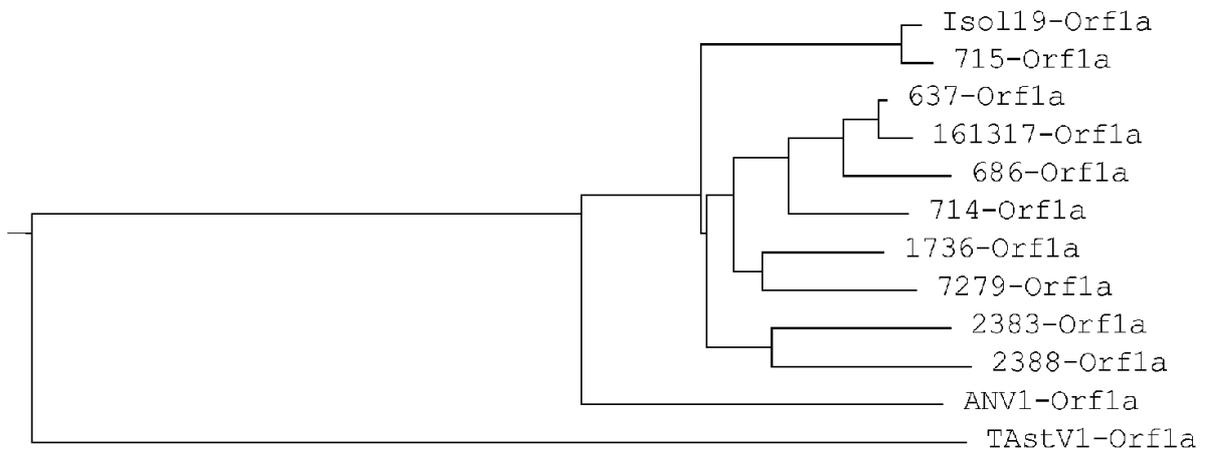


Figura 4

```

ANV1-Orfla      2213 ACCAAAGCGATCTCTAAGGCTGCCTTCATGAAAACATAAGTCCTCACCGA
Isol19-Orfla    1  ..T...T.....A..A.....A.....T.....
                                     |----->|
                                     cebador

ANV1-Orfla      2263 AGAAGAATATCGCCGGTTAGAGGAGGAAGGCTTCACTAAAGATGAGATCA
Isol19-Orfla    51  .....C..T.....A.....T.A.....T.
      /----->|
      SEQ ID NO 30

ANV1-Orfla      2313 AGGACATCGTTGACAATCTCAGAGAGCAGGCGTGGCTCGACTATCAGAAC
Isol19-Orfla    101 .A..G.....G.....GC...A..A..C...A...T..C.....T

ANV1-Orfla      2363 CAACTTGATGAAGAAGGTGATGATGACTGGTACGAACAAATGGAAGAGGA
Isol19-Orfla    151 ..G..A.....T..G.....ACT..A..

ANV1-Orfla      2413 TCAAAGAATTAATGATCAAATTGACCAAACATTGAAAGAGACCTCGAGG
Isol19-Orfla    201 .....G.G.....TA.GC.A....GCA.....T..A.

ANV1-Orfla      2463 ATAGAGGTGAATGGTATGGTCAG-----AGGAAAATAACCTTC
Isol19-Orfla    251 ..C....A.....C...TCTGGGAAACCT....GG.....T
                                     |-----<|
                                     cebador SEQ ID NO: 31

ANV1-Orfla      2501 AAGCAAAGAGCGATGCTTCGTTTCATTCAACTTGGCCGGCAACAACAGGT
Isol19-Orfla    301 ..A..G.....C.....G.....T..A.....AA.

ANV1-Orfla      2551 GGCCACTGTCTCATTTCCTGATGGTTATGAGGACAGAGCTGAAGAACTCT
Isol19-Orfla    351 A.....AA.T.....C.....A..T.....

ANV1-Orfla      2601 ACAATAA
Isol19-Orfla    401 .T.....
    
```

Figura 5

