

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 944 359**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/689

(2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2018 PCT/EP2018/062090**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.11.2018 WO18206690**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2018 E 18723007 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.03.2023 EP 3622082**

54 Título: **Procedimiento de detección de enfermedades inducidas por *C. perfringens* en una bandada de aves**

30 Prioridad:

**12.05.2017 EP 17170811
11.07.2017 US 201762531000 P
01.08.2017 CN 201710646838**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.06.2023

73 Titular/es:

**EVONIK OPERATIONS GMBH (100.0%)
Rellinghauser Straße 1-11
45128 Essen, DE**

72 Inventor/es:

**FLÜGEL, MONIKA;
PELZER, STEFAN;
VAN IMMERSEEL, FILIP;
DUCATELLE, RICHARD;
GOOSSENS, EVY;
HARK, SARAH;
THIEMANN, FRANK y
BÖHL, FLORIAN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 944 359 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

Procedimiento de detección de enfermedades inducidas por *C. perfringens* en una bandada de aves

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un procedimiento para detectar enfermedades inducidas por *C. perfringens* en animales. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento para determinar si un animal o una población animal padece o no enfermedades inducidas por *C. perfringens* en estado clínico o subclínico.

10

Antecedentes de la invención

El *Clostridium perfringens* es un patógeno omnipresente que utiliza un arsenal de toxinas para provocar infecciones histotóxicas e intestinales en animales y también en seres humanos. El *C. perfringens* es un anaerobio Gram-positivo, en forma de bastoncillo, formador de esporas, tolerante al oxígeno. No todas las cepas de *C. perfringens* son virulentas. Las cepas de *C. perfringens* virulentas se clasifican tradicionalmente en cinco tipos de toxinas (A, B, C, D y E), basándose en la producción de cuatro toxinas principales sospechosas (alfa, beta, épsilon e iota). Dependiendo de las toxinas producidas (toxinas principales y adicionales tales como NetB, Cpb2 y otras), los síndromes/enfermedades específicos de subespecies de *C. perfringens* se pueden inducir en diferentes organismos huésped [Rood, J. I. (1998) "Virulence genes of *Clostridium perfringens*"; *Annual Review of Microbiology* 52: 333-360]. Las toxinas están codificadas por secuencias de polinucleótidos ubicadas en el cromosoma y/o en plásmidos de toxinas [Popoff, M. R. y P. Bouvet (2013). "Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and toxin gene evolution" *Toxicon* 75: 63-89].

Como patógeno animal, el *C. perfringens* es responsable de varias enfermedades graves, incluida la enteritis necrótica aviar, que supone unas pérdidas de aproximadamente 6 mil millones de dólares estadounidenses/año para el sistema agrícola mundial [Wade, B., Keyburn, A.L. (2015), "The true cost of necrotic enteritis" *World Poultry* 31, 16-17].

La enteritis necrótica (EN) es una enfermedad entérica de las aves de corral que se describió por primera vez en 1961. La EN en pollos se manifiesta como una enterotoxemia aguda o crónica. La enfermedad aguda tiene como consecuencia niveles significativos de mortalidad debido al desarrollo de lesiones necróticas en la pared intestinal, mientras que la enfermedad crónica produce una pérdida significativa de productividad y bienestar. Los primeros estudios sobre EN sugirieron que el principal factor de virulencia involucrado en la enfermedad era la alfa-toxina (conocida como Cpa o Plc), que tiene actividad de fosfolipasa C y de esfingomielinasa [Keyburn, A. L. et al. (2006) "Alpha-toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens", *Infection and Immunity* 74(11): 6496-6500]. Todas las cepas de *C. perfringens* albergan el gen que codifica la alfa-toxina [Rood, J. I. (1998) "Virulence genes of *Clostridium perfringens*", *Annual Review of Microbiology* 52: 333-360; Titball, R. W., et al. (1999) "The *Clostridium perfringens* α -toxin". *Anaerobe* 5 (2): 51-64]. Sin embargo, estudios recientes han mostrado que la alfa-toxina parece no ser un factor de virulencia esencial, ya que las cepas mutantes de alfa-toxina eran capaces de provocar EN, lo que cuestiona el papel de la alfa-toxina en la enfermedad en general. En estudios más recientes, se ha sugerido que la nueva toxina formadora de poros, NetS, desempeña un papel clave en el desarrollo de esta enfermedad [Keyburn, A. L. et al. (2008) "NetS, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*" *PLoS Pathogens* 4 (2)].

Se sabe que la EN afecta a pollos de engorde, gallinas ponedoras, pavos y codornices. La forma clínica se observa con mayor frecuencia en pollos de engorde de dos a cinco semanas de edad. Por lo general, esto también se encuentra cerca del momento en que las dietas se cambian de alimento de inicio a alimento de crecimiento y cerca del periodo de transición del sistema inmunológico materno al sistema inmunológico adaptativo, respectivamente, por lo que el oportunista *C. perfringens* puede aprovechar este periodo de transición en el entorno intestinal y proliferar [Timbermont, L. et al. (2011) "Necrotic enteritis in broilers: An updated review on the pathogenesis." *Avian Pathology* 40 (4): 341-347].

Aparte de la mera asociación de los factores de virulencia de por sí con la incidencia de EN, todavía existe una gran tarea pendiente para mostrar el vínculo mecanicista entre estos factores y el establecimiento de la enfermedad en aves o de otras enfermedades inducidas por *C. perfringens* en otros animales (de granja).

Además, relacionar la infección por EN subclínica con cualquiera de estos factores de virulencia es extremadamente difícil de lograr, ya que las aves carecen de signos que justifiquen su examen antes del sacrificio. Por lo tanto, sigue siendo imperativa la necesidad de un procedimiento para la detección temprana de EN y, lo que es más importante, las formas subclínicas de EN. Se aplican consideraciones similares para otras enfermedades de animales inducidas por *C. perfringens*, en particular de animales para la producción ganadera, tales como enteritis en cerdos, caballos, potros, cabras, conejos, corderos, perros y bovinos; diarrea en cerdos; enterotoxemia en ovinos, caprinos y bovinos; enteritis necrosante en lechones, corderos, potros y terneros (neonatales); tiflocolitis en caballos; gastroenteritis hemorrágica canina mortal; enterocolitis necrosante mortal del potro; gangrena gaseosa (mionecrosis clostridial) en ovinos, bovinos, equinos y otras especies [Rood, J. I. (1998) "Virulence genes of *Clostridium perfringens*" *Annual Review of Microbiology* 52: 333-360].

La enterotoxemia bovina provocada por *Clostridium perfringens* es un síndrome de muerte súbita con lesiones necro-hemorrágicas en el intestino delgado, que afecta principalmente a terneros lactantes y terneros de engorde [Goossens, E. et al. (2014), "*Clostridium perfringens* strains from bovine enterotoxaemia cases are not superior in in vitro production of alpha toxin, perfringolysin O and proteolytic enzymes" *BMC Veterinary Research* 10; Lebrun M, Mainil JG, Linden A: "Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis" *Vet Rec* 2010, 167 (1): 13-22]. En los terneros de engorde, se ven afectadas predominantemente las razas de bovino de carne. El síndrome representa aproximadamente el 20% de la mortalidad de estos terneros, en comparación con el 4% de los terneros de raza lechera y mestizos [Pardon B, De Bleecker K, Hostens M, Callens J, Dewulf J, Deprez P: "Longitudinal study on morbidity and mortality in white veal calves in Belgium" *BMC Vet Res* 2012, 8:26].

Los procedimientos actuales se basan en el examen de animales individualizados y utilizan necropsia e histopatología posterior o ensayos para identificar el patógeno. Sin embargo, el seguimiento de biomarcadores de tejidos o biomarcadores sanguíneos es, debido a su naturaleza invasiva, lento y poco práctico cuando se trata de un gran número de muestras, como sucede con los animales de granja.

La solicitud de patente europea EP 3 112 474 A1, recientemente publicada, describe un procedimiento para detectar EN aviar mediante el aislamiento de microvesículas de una muestra aviar y posteriormente determinar la presencia y/o el nivel de marcadores de ARN indicativos de EN. La muestra aviar puede ser un fluido corporal o un excremento corporal y el marcador indicativo de EN se selecciona de *C. perfringens* y secuencias huésped específicas, homólogos y fragmentos de las mismas. Sin embargo, las microvesículas deben aislarse y lisarse antes del análisis y la cuantificación de los marcadores de ARN.

Por lo tanto, existía aún la necesidad de proporcionar un procedimiento rápido, fiable y no invasivo *ante mortem* para determinar si una población animal padece o no enfermedades inducidas por *C. perfringens* que se pueda realizar a bajo coste y con un esfuerzo mínimo.

Sumario de la invención

En consecuencia, un objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para detectar enfermedades inducidas por *C. perfringens* en una bandada de aves, comprendiendo el procedimiento

- a) recolectar material de muestra de la bandada de aves en puntos temporales consecutivos;
 - b) determinar la cantidad de un primer marcador y un segundo marcador contenidos en el material de muestra y
 - c) determinar la relación del primer marcador con respecto al segundo marcador contenidos en el material de muestra;
- en el que el primer marcador comprende una secuencia de polinucleótidos que es específica para las subespecies de *C. perfringens* que inducen la enfermedad diana;
- y el segundo marcador comprende un polinucleótido que es específico para la especie *C. perfringens*; y
- en el que un aumento en la relación del primer marcador con respecto al segundo marcador en el material de muestra analizado a lo largo del tiempo es una indicación de la enfermedad diana.

En las reivindicaciones adjuntas se divulgan formas de realización del procedimiento de la invención.

A continuación, se describen en detalle los aspectos cruciales de la presente invención.

Descripción detallada de la invención

Detección de enfermedades inducidas por C. perfringens en animales

Los presentes inventores han descubierto, inesperadamente, que la relación de un primer polinucleótido marcador con respecto a un segundo polinucleótido marcador en excrementos de animales se correlaciona con la manifestación de enfermedades inducidas por la bacteria *C. perfringens*. Más específicamente, los presentes inventores han descubierto que un aumento en la relación de los marcadores mencionados anteriormente a lo largo del tiempo es una indicación de la enfermedad diana.

En consecuencia, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar enfermedades inducidas por *C. perfringens* en una bandada de aves, comprendiendo el procedimiento:

- a) recolectar material de muestra de la bandada de aves en momentos determinados consecutivos;
- b) determinar la cantidad de un primer marcador y un segundo marcador contenidos en el material de muestra y

c) determinar la relación del primer marcador con respecto al segundo marcador contenidos en el material de muestra;

en el que el primer marcador comprende una secuencia de polinucleótidos que es específica para las subespecies de *C. perfringens* que inducen la enfermedad diana;

y el segundo marcador comprende un polinucleótido que es específico para la especie *C. perfringens*; y

en el que un aumento en la relación del primer marcador con respecto al segundo marcador en el material de muestra analizado a lo largo del tiempo es una indicación de la enfermedad diana.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "polinucleótidos" se refiere a ADN o ARN. En una forma de realización particularmente preferida, el término "polinucleótidos" se refiere a ADN.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "enfermedad" se refiere a cualquier condición anormal en un animal que interfiere con sus procesos fisiológicos vitales, provocada por cepas de *C. perfringens* patógenas. El término "enfermedad" corresponde a un aumento de los factores de patogenicidad y, por lo tanto, también incluye etapas tempranas de la enfermedad diana, así como un determinado riesgo de que se desencadene la enfermedad diana. De acuerdo con esto y tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término "enfermedad diana" se refiere a la enfermedad específica inducida por *C. perfringens* (que se produce en especies animales específicas) para la que se va a analizar la muestra animal.

Marcadores

El primer marcador comprende una secuencia de polinucleótidos que es específica para las subespecies de *C. perfringens* que inducen la enfermedad diana. Es decir, el primer marcador representa una región específica y conservada que determina la virulencia y la patogenicidad de las subespecies de *C. perfringens* seleccionadas. En una forma de realización preferida, el primer marcador constituye un factor de virulencia para la enfermedad diana.

El primer marcador puede ser un gen marcador que codifique una toxina específica u homólogos o fragmentos del mismo o, alternativamente, una isla de patogenicidad. En el contexto de la presente invención, el término "homólogo" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido o gen marcador respectivo. El término "fragmento" se refiere a una secuencia de polinucleótidos que está truncada en no más de 100 u 80, preferentemente en no más de 70, especialmente en no más de 60, de la forma más preferida en no más de 50 nucleótidos en comparación con el polinucleótido o gen marcador respectivo.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "isla de patogenicidad" (PAI) se refiere a unidades genéticas discretas que portan genes que codifican uno o más factores de virulencia [Hacker et al. (1997) "Pathogenicity islands of virulent Bacteria: structure and impact on microbial evolution", *Molecular Microbiology* 23(6): 1089-1097]. La PAI puede contener genes para regular los genes de virulencia codificados en la PAI o puede contener genes para regular genes fuera de la PAI. Las islas de patogenicidad se incorporan en el genoma (cromosómicamente o extracromosómicamente) de la cepa de *C. perfringens* patógena.

El primer marcador puede estar ubicado en un plásmido de toxina de *C. perfringens* y/o en el cromosoma de *C. perfringens*.

Como ejemplo, el gen *cpe* puede usarse como un primer gen marcador. Dicho gen *cpe* se puede encontrar en una región variable del cromosoma en algunas cepas de *C. perfringens* y en plásmidos grandes en otras cepas [Petit et al. (1999) "Clostridium perfringens: toxinotype and genotype", *Trends in Microbiology* Vol. 7, Nº 3, 104-110].

En una forma de realización particularmente preferida, el gen marcador está ubicado en un plásmido de toxina de *C. perfringens*.

Las cepas de *C. perfringens* pueden portar múltiples plásmidos grandes de resistencia a toxinas y antibióticos, por lo que estos plásmidos están estrechamente relacionados y comparten hasta 35 kb de secuencias casi idénticas [Wisniewski et al. (2017) "The T_{cp} conjugation system of *Clostridium perfringens*", *Plasmid* 91, 28-36]. Las toxinas codificadas por plásmidos son, por ejemplo, la toxina beta, la toxina beta2, la toxina épsilon, la toxina iota, NetS y TpeL [Li, J., et al. (2013); "Toxin plasmids of *Clostridium perfringens*"; *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 77(2): 208-233].

Las principales enfermedades asociadas a *C. perfringens* en animales y las toxinas clave se enumeran en la tabla siguiente [Popoff, M. R. (2014) "Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors." *Anaerobe* 30: 220-238; Rood, J. I. (1998) "Virulence genes of *Clostridium perfringens*" *Annual Review of Microbiology* 52: 333-360; Gohari, I. M. et al. (2015) "A novel pore-forming toxin in type A *Clostridium perfringens* is associated with both fatal canine

hemorrhagic gastroenteritis and fatal foal necrotizing enterocolitis" PLoS ONE 10(4); Keyburn, A. L., et al. (2008) "NetS, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*" PLoS Pathogens 4(2)]:

Enfermedad	Huésped	Factor de virulencia	Referencia
Gangrena gaseosa (mionecrosis por clostridios)	Ser humano	Perfringolisina (toxina theta), toxina alfa (Cpa)	Rood, 1998
Intoxicación alimentaria (intoxicación transmitida por alimentos), diarrea esporádica	Ser humano	Enterotoxina (Cpe)	Popoff, 2014
Diarrea	Cerdo	Enterotoxina (Cpe)	Popoff, 2014
Enteritis necrótica (pigbel; Darmbrand)	Ser humano	Toxina beta (Cpb)	Rood, 1998
Enterotoxemia	Oveja, cabra, ganado vacuno	Toxina épsilon (Etx)	Popoff, 2014
No identificada	Ser humano, animales	Toxina delta	Popoff, 2014
Enteritis necrosante	Lechón, ternero	Toxina beta (Cpb)	Popoff, 2014
Enterotoxemia (pasmo)	Oveja	Toxina beta (Cpb)	Popoff, 2014
Enteritis necrosante	Lechón	Toxina beta2 (Cpb2)	Popoff, 2014
Tiflocolitis	Caballo	Toxina beta2 (Cpb2)	Popoff, 2014
Gastroenteritis hemorrágica canina mortal	Canino	NetF	Gohari, 2015
Enterocolitis necrosante mortal del potro	Potro	NetF	Gohari, 2015
Enteritis necrótica aviar	Aves	NetB	Keyburn, 2008

- 5 En consecuencia, el primer gen marcador también se puede seleccionar del grupo que consiste en *cpe*, toxina beta (*cpb*), toxina beta2 (*cpb2*), toxina épsilon (*etx*), *netF* y *netB* y homólogos y fragmentos de estos genes. Alternativamente, también pueden usarse secuencias de polinucleótidos que comprenden uno de los genes mencionados anteriormente. Preferentemente, estas secuencias de polinucleótidos se alargan no más de 100 pares de bases o no más de 80 pares de bases, preferentemente no más de 70 pares de bases o no más de 60 pares de bases, especialmente no más de 50 pares de bases o no más de 40 pares de bases y de la forma más preferida no más de 30 pares de bases en comparación con los respectivos genes marcadores.

En una forma de realización preferida, el gen *netB* se utiliza como primer marcador.

- 15 El segundo marcador comprende una secuencia de polinucleótidos que es específica para la especie *C. perfringens* en general y representa una región conservada y específica del genoma de *C. perfringens* (cromosómicamente o extracromosómicamente).

- 20 El segundo marcador puede ser una secuencia de polinucleótidos o un gen marcador específico ubicado en un plásmido de *C. perfringens* o en el cromosoma de *C. perfringens*. Se prefiere particularmente un gen marcador ubicado en el cromosoma de *C. perfringens*.

- 25 Preferentemente, el segundo gen marcador se selecciona del grupo que consiste en los genes *cpa*, *ADNr 16S*, *virR*, *virS*, *pfoA* y homólogos y fragmentos de estos genes. Alternativamente, también pueden usarse secuencias de polinucleótidos que comprenden uno de los genes mencionados anteriormente.

El gen *cpa* es particularmente preferido como segundo marcador.

- 30 La enfermedad inducida por *C. perfringens* puede seleccionarse del grupo que consiste en enteritis necrótica aviar; enteritis en perros, cerdos, caballos, potros, cabras, conejos, corderos y ganado vacuno; diarrea en cerdos; enterotoxemia en ovejas, cabras y ganado vacuno; enteritis necrosante en lechones, corderos, potros y terneros (neonatal); tiflocolitis en caballos; gastroenteritis hemorrágica canina mortal; enterocolitis necrosante mortal del potro; gangrena gaseosa (*mionecrosis por clostridios*) en ovejas, ganado vacuno, caballos y otras spp. o en seres humanos y *enteritis necrótica* humana. El procedimiento anterior es particularmente adecuado para detectar enteritis necrótica aviar.

- 40 Además, el procedimiento según la presente invención es particularmente adecuado para detectar enfermedades inducidas por *C. perfringens* que se encuentran en estado subclínico o latente. En dichas formas subclínicas o latentes de infecciones por *C. perfringens* no hay presencia de signos clínicos evidentes y por lo general no hay un pico de mortalidad. En una forma de realización particularmente preferida, el procedimiento anterior se usa para detectar enteritis necrótica aviar en estado subclínico o latente.

Determinación de enfermedades inducidas por C. perfringens en animales individuales

En un aspecto relacionado de la divulgación que no forma parte de la invención, el procedimiento de la presente invención puede usarse para determinar si un animal individual padece o no una enfermedad inducida por *C. perfringens*. En ese caso, el material de muestra procede de un animal individual.

El animal individual puede ser, por ejemplo, una mascota o animal doméstico, un animal de granja tal como el que se encuentra en instalaciones ganaderas, un animal salvaje o un animal de zoológico. Además, los animales individuales que se transportan para su sacrificio o para su reubicación pueden examinarse utilizando el procedimiento anterior.

Como ejemplo, el material de muestra procedente de un perro individual recogido en momentos determinados consecutivos puede analizarse según el procedimiento anterior para determinar si el perro padece o no gastroenteritis hemorrágica canina mortal. En este caso concreto, *netF* es un primer marcador adecuado y *cpa* es un segundo marcador adecuado.

El material de muestra se selecciona del grupo que consiste en muestras de polvo, muestras de hisopos, muestras del lecho, muestras de estiércol líquido, muestras de pelo, muestras de plumas, muestras de piel y muestras de excrementos corporales y soluciones o suspensiones de los mismos. Los excrementos corporales son los excrementos urinarios, fecales o cecales. En una forma de realización preferida, el material de muestra son heces.

En general, el término "lecho" debe entenderse como una mezcla de excrementos de animales con el material de yacija.

Tal como se utiliza en el contexto de este aspecto, el término "muestras del lecho" se refiere a excrementos de un animal individual. Además, en el contexto de esta forma de realización, el término "muestras de estiércol líquido" se refiere a una muestra de excrementos que contiene heces y orina de un animal individual.

Las muestras de animales individuales pueden tomarse directamente del animal, por ejemplo con hisopos.

Alternativamente, y especialmente en el caso de animales alojados individualmente, el material de muestra se puede recolectar del suelo del corral, la jaula o la rejilla. El material de muestra debe poder asignarse al animal investigado.

Los volúmenes de muestra adecuados son, por ejemplo, de 0,05 ml a 20 ml o de 0,1 a 20 ml, en particular de 0,2 a 10 ml, preferentemente de 0,5 a 5 ml. Las masas de muestra adecuadas son, por ejemplo, de 0,05 g a 20 g o de 0,1 a 20 g, en particular de 0,2 a 10 g, preferentemente de 0,5 a 5 g.

Determinación de enfermedades inducidas por C. perfringens en poblaciones animales

El procedimiento de la invención se usa para determinar si una población animal padece o no una enfermedad inducida por *C. perfringens*.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "población animal" se refiere a un grupo de individuos animales que pertenecen a la misma especie. La población animal puede ser, por ejemplo, un grupo de mascotas o animales domésticos que se encuentran en la cría de animales, un grupo de animales de granja que se encuentran en producción ganadera o en cría ganadera, o un grupo de animales salvajes o animales de zoológico.

La población animal según la invención es una bandada de aves. En una forma de realización preferida, la población animal es una manada de animales tal como se encuentra en procesos de producción ganadera. En otros aspectos no cubiertos por la presente invención, la población animal o la manada de animales puede ser un rebaño de ovejas, cabras o ganado vacuno, una manada de caballos o una piara de cerdos.

El procedimiento de la presente invención es particularmente adecuado para determinar el estado de salud de una población animal mediante ensayos combinados. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "ensayo combinado" se refiere a un procedimiento de ensayo en el que el material de muestra es una muestra combinada de una población animal.

Una "muestra combinada" debe entenderse como una muestra compuesta de muestras separadas seleccionadas aleatoriamente, una muestra tomada con uno o varios hisopos de tela humedecidos o muestras combinadas compuestas por muestras separadas de muestras frescas tomadas aleatoriamente de varios sitios en el alojamiento o el espacio en el que se mantiene la población animal o la manada de animales. Las muestras combinadas reflejan la cantidad de polinucleótidos marcadores o genes marcadores de patógenos presentes en la población animal.

El material de muestra se selecciona del grupo que consiste en muestras de polvo, muestras del lecho, muestras de estiércol líquido, muestras de pelo, muestras de plumas, muestras de piel, muestras de hisopos y muestras de excrementos corporales y soluciones o suspensiones de los mismos. Los excrementos corporales son excrementos urinarios, fecales o cecales. En una forma de realización preferida, el material de muestra son heces.

Tal como se utiliza en el contexto de esta forma de realización, el término "muestras del lecho" se refiere a excrementos mixtos presentes en el corral, la jaula o la rejilla. Además, en el contexto de la presente forma de realización, el término "muestras de estiércol líquido" se refiere a muestras de excrementos mixtos que contienen heces y orina.

Estas muestras del lecho pueden recolectarse, por ejemplo, de una población animal utilizando el procedimiento del cubrezapatos o utilizando pinzas para lechos en diferentes ubicaciones del corral.

Las calzas que son lo suficientemente absorbentes para absorber la humedad son particularmente adecuadas para recolectar muestras animales combinadas. Los calcetines de gasa tubulares también son aceptables.

Los volúmenes de muestra adecuados son, por ejemplo, de 0,1 a 20 ml, en particular de 0,2 a 10 ml, preferentemente de 0,5 a 5 ml. Las masas de muestra adecuadas son, por ejemplo, de 0,1 a 20 g, en particular de 0,2 a 10 g, preferentemente de 0,5 a 5 g.

La población animal es una manada de aves. La manada de aves según la invención es preferentemente de aves de corral. Las aves de corral preferidas según la invención son pollos, pavos, patos y gansos. Las aves de corral se pueden optimizar para producir ganado joven. Este tipo de aves de corral también se conoce como animales progenitores y abuelos. Por consiguiente, los animales progenitores y abuelos preferidos son los pollos de engorde progenitores (o abuelos), los patos progenitores (o abuelos), los pavos progenitores (o abuelos) y los gansos progenitores (o abuelos).

Las aves de corral según la invención también se pueden seleccionar de entre aves de corral domésticas y aves silvestres. Las aves de corral domésticas o aves silvestres preferidas son pavos reales, faisanes, perdices, pintadas, codornices, urogallos, gansos, palomas y cisnes. Otras aves de corral preferidas según la invención son avestruces y loros. Las aves de corral más preferidas según la invención son los pollos de engorde.

Para realizar el procedimiento anterior, las muestras animales se recolectan en puntos temporales consecutivos.

Preferentemente, las muestras se toman semanalmente, diariamente o cada hora. Se prefiere particularmente recolectar las muestras animales en días consecutivos.

En una forma de realización particularmente preferida, el primer y el segundo marcador se detectan a nivel de ADN, es decir, los polinucleótidos son polinucleótidos de ADN.

Los polinucleótidos marcadores pueden aislarse de las muestras animales antes de la cuantificación. El aislamiento de polinucleótidos se puede realizar, por ejemplo, mediante extracción utilizando el procedimiento de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o utilizando diversos kits comerciales de extracción de ácidos nucleicos, en los que la lisis celular se realiza mediante lisis química y/o mediante disrupción celular mecánica y el ácido nucleico se captura en matrices de sílice o en perlas magnéticas revestidas de sílice. Los kits de extracción comerciales especializados en materia fecal o material agresivo son particularmente adecuados.

Los genes marcadores pueden detectarse y/o cuantificarse mediante procedimientos comúnmente conocidos tales como secuenciación, hibridación o diversas técnicas de PCR conocidas en la técnica.

En una forma de realización alternativa, los genes marcadores contenidos en la muestra animal pueden cuantificarse directamente, por ejemplo, mediante técnicas de PCR, qPCR, secuenciación o hibridación.

La presente invención proporciona además un kit de diagnóstico que comprende un conjunto de oligonucleótidos (cebadores y sondas) para amplificar y/o cuantificar al menos un polinucleótido que codifica al menos uno de los genes marcadores. En una forma de realización preferida, el kit de diagnóstico comprende cebadores y sondas de PCR tanto para el primer marcador como para el segundo marcador. Más específicamente, el kit de diagnóstico comprende cebadores y sondas de PCR para detectar tanto el primer marcador como el segundo marcador, en el que el primer marcador comprende una secuencia de polinucleótidos que es específica para las subespecies de *C. perfringens* que inducen la enfermedad diana y el segundo marcador comprende un polinucleótido que es específico para la especie *C. perfringens*. El kit puede comprender además soluciones tampón, tales como tampón PCR; sales de magnesio; trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP). El kit también puede incluir elementos tales como tubos de recogida de muestras, reactivos para aislar los ácidos nucleicos y/o instrucciones para su uso.

Detección de enteritis necrótica aviar

Los solicitantes han descubierto, inesperadamente, que la aparición de enteritis necrótica (subclínica) puede determinarse mediante el seguimiento del desarrollo de la relación *netB/cpa* en muestras de aves a lo largo del tiempo.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar la enteritis necrótica aviar, comprendiendo el procedimiento:

- a) recolectar muestras de una población aviar específica en momentos determinados consecutivos;
- b) determinar la cantidad de un primer marcador y un segundo marcador contenidos en el material de muestra; y
- c) determinar la relación del primer marcador con respecto al segundo marcador contenidos en el material de muestra;

en el que el primer marcador es *netB* u homólogos o fragmentos del mismo;

el segundo marcador es *cpa* u homólogos o fragmentos del mismo;

y

en el que un aumento en la relación entre el primer marcador y el segundo marcador en el material de muestra analizado a lo largo del tiempo es una indicación de enteritis necrótica aviar.

Como alternativa, el primer marcador también puede ser una secuencia de polinucleótidos que comprende *netB* y/o el segundo marcador puede ser una secuencia de polinucleótidos que comprende *cpa*. Preferentemente, estas secuencias de polinucleótidos se alargan no más de 100 pares de bases o no más de 80 pares de bases, preferentemente no más de 70 pares de bases o no más de 60 pares de bases, especialmente no más de 50 pares de bases o no más de 40 pares de bases y de la forma más preferida no más de 30 pares de bases en comparación con los genes *netB* y *cpa*.

El término "enteritis necrótica" se refiere a la EN tanto en estado clínico como subclínico/latente.

Por lo tanto, en una forma de realización particularmente preferida, la presente invención proporciona un procedimiento para detectar enteritis necrótica aviar, comprendiendo el procedimiento:

- a) recolectar muestras de una población aviar específica en momentos determinados consecutivos;
- b) determinar la cantidad de un primer marcador y un segundo marcador contenidos en el material de muestra; y
- c) determinar la relación del primer marcador con respecto al segundo marcador contenidos en el material de muestra;

en el que el primer marcador es *netB* y el segundo marcador es *cpa*;

y

en el que un aumento en la relación entre el primer marcador y el segundo marcador en el material de muestra analizado a lo largo del tiempo es una indicación de enteritis necrótica aviar.

Las secuencias de polinucleótidos de *netB* y *cpa* son conocidas en la técnica. Sin embargo, en aras de la claridad y la exhaustividad, la secuencia de consenso de *netB* se indica con SEQ ID NO. 1 y la secuencia de consenso de *cpa* se indica con SEQ ID NO. 2.

El gen de la toxina alfa (*cpa*) está presente en el cromosoma de todas las cepas de *C. perfringens* (patógenas y no patógenas), lo que significa que la concentración de *cpa* debe tener niveles similares en muestras de excrementos de animales sanos e infectados con EN e indica la presencia de *C. perfringens* solo en general.

El procedimiento anterior se puede utilizar para determinar si un individuo aviar padece o no enteritis necrótica (subclínica/latente) o, en una forma de realización alternativa, para determinar si una población aviar padece o no enteritis necrótica (subclínica/latente) ("ensayo combinado").

En caso de que se vaya a examinar un sujeto aviar individual, el material de muestra puede seleccionarse del grupo que consiste en muestras de polvo, muestras de hisopos, muestras del lecho, muestras de estiércol líquido, muestras de plumas y muestras de excrementos corporales y soluciones o suspensiones de los mismos. Los excrementos corporales son excrementos urinarios, fecales o cecales. En una forma de realización preferida, el material de muestra son heces.

En general, el término "lecho" debe entenderse como una mezcla de excrementos de animales con el material de yacija.

Tal como se utiliza en el contexto de esta forma de realización, el término "muestras del lecho" se refiere a los excrementos de un sujeto aviar individual. Además, en el contexto de esta forma de realización, el término "muestras

de estiércol líquido" se refiere a una muestra de excremento que contiene heces y orina de un animal individual.

Las muestras de sujetos aviares individuales se pueden tomar directamente del ave, por ejemplo con hisopos. Alternativamente, y especialmente en el caso de animales alojados individualmente, el material de muestra se puede recolectar del suelo del corral, la jaula o la rejilla. El material de muestra debe poder asignarse al animal investigado.

Los volúmenes de muestra adecuados son, por ejemplo, de 0,05 ml a 20 ml o de 0,1 a 20 ml, en particular de 0,2 a 10 ml, preferentemente de 0,5 a 5 ml. Las masas de muestra adecuadas son, por ejemplo, de 0,05 g a 20 g o de 0,1 a 20 g, en particular de 0,2 a 10 g, preferentemente de 0,5 a 5 g.

En caso de que se vaya a determinar el estado de salud de una población aviar, se examina una muestra combinada de la población aviar ("ensayo combinado"). Una "muestra combinada" debe entenderse como una muestra compuesta de muestras separadas seleccionadas aleatoriamente, una muestra tomada con uno o varios hisopos de tela humedecidos o muestras combinadas compuestas por muestras separadas de muestras frescas tomadas aleatoriamente de varios sitios en el alojamiento o el espacio en el que se mantiene la población aviar. Las muestras combinadas reflejan la cantidad de genes marcadores *netB* patógenos presentes en la población animal.

El material de muestra puede seleccionarse del grupo que consiste en muestras de polvo, muestras del lecho, muestras de estiércol líquido, muestras de plumas, muestras de hisopos y muestras de excrementos corporales y soluciones o suspensiones de los mismos. Los excrementos corporales son excrementos urinarios, fecales o cecales. En una forma de realización preferida, el material de muestra son heces.

Tal como se utiliza en el contexto de esta forma de realización, el término "muestras del lecho" se refiere a excrementos mixtos presentes en el corral, la jaula o la rejilla. Estas muestras del lecho pueden recolectarse, por ejemplo, de una población utilizando el procedimiento de cubrezapatos o utilizando pinzas para lechos en diferentes ubicaciones del corral. Además, en el contexto de la presente forma de realización, el término "muestras de estiércol líquido" se refiere a muestras de excrementos mixtos que contienen heces y orina.

Las calzas que son lo suficientemente absorbentes para absorber la humedad son particularmente adecuadas para recolectar muestras animales combinadas. Los calcetines de gasa tubulares también son aceptables.

La población animal es una bandada de aves. La bandada de aves según la invención es preferentemente de aves de corral. Las aves de corral preferidas según la invención son pollos, pavos, patos y gansos. Las aves de corral se pueden optimizar para producir individuos jóvenes. Este tipo de aves de corral también se conoce como animales progenitores y abuelos. Por consiguiente, los animales progenitores y abuelos preferidos son los pollos de engorde progenitores (o abuelos), los patos progenitores (o abuelos), los pavos progenitores (o abuelos) y los gansos progenitores (o abuelos).

Las aves de corral según la invención también se pueden seleccionar de entre aves de corral domésticas y aves silvestres. Las aves de corral domésticas o aves silvestres preferidas son pavos reales, faisanes, perdices, pintadas, codornices, urogallos, gansos, palomas y cisnes. Otras aves de corral preferidas según la invención son avestruces y loros. Las aves de corral más preferidas según la invención son los pollos de engorde.

Los volúmenes de muestra adecuados son, por ejemplo, de 0,1 a 20 ml, en particular de 0,2 a 10 ml, preferentemente de 0,5 a 5 ml. Las masas de muestra adecuadas son, por ejemplo, de 0,1 a 20 g, en particular de 0,2 a 10 g, preferentemente de 0,5 a 5 g.

Por lo general, las muestras deben tomarse y analizarse semanalmente, diariamente o cada hora. En una forma de realización preferida, las muestras animales se recolectan en días consecutivos. Preferentemente, la recogida de muestras y el análisis de muestras se inician antes del día 14. Por ejemplo, la recogida de muestras y el análisis de muestras se inician diariamente desde el día 1, desde el día 5, desde el día 10 o desde el día 13.

Los genes marcadores *netB* y *cpa* pueden aislarse de las muestras animales antes de la cuantificación. El aislamiento de polinucleótidos se puede realizar, por ejemplo, por medio de extracción utilizando el procedimiento de bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) o mediante diversos kits comerciales de extracción de ácido nucleico, en los que la lisis celular se realiza mediante lisis química y/o disrupción celular mecánica y el ácido nucleico se captura en matrices de sílice o en perlas magnéticas revestidas de sílice. Los kits de extracción comerciales especializados en material fecal o material duro son especialmente adecuados.

Los genes marcadores pueden detectarse y/o cuantificarse mediante procedimientos comúnmente conocidos tales como secuenciación, hibridación o diversas técnicas de PCR conocidas en la técnica.

En una forma de realización alternativa, los genes marcadores contenidos en la muestra animal pueden cuantificarse directamente, por ejemplo mediante técnicas de PCR, qPCR, secuenciación o hibridación.

Las lesiones intestinales causadas por enteritis necrótica subclínica o clínica se puntuaron utilizando una escala de 0 a 6 [Keyburn et al. (2006) "Alpha toxin of *Clostridium perfringens* is not an essential virulence factor in necrotic enteritis in chickens", *Infect. Immun.* 74: 6496-6500]. Según esto, las lesiones en el intestino delgado (duodeno a íleon) se puntuaron de la forma siguiente: puntuación 0 = sin lesiones macroscópicas; 1 = mucosa intestinal congestionada; 2 = pequeña necrosis o ulceración focal (1-5 focos); 3 = necrosis o ulceración focal (6-15 focos); 4 = necrosis o ulceración focal (16 o más focos); 5 = parches de necrosis de 2-3 cm de largo; 6 = necrosis difusa típica de casos de campo. Las puntuaciones de lesión de 5 a 6 corresponden a enteritis necrótica clínica; las puntuaciones de lesión de 1 a 4 corresponden al estado subclínico.

Los inventores han descubierto que una relación de genes marcadores *netB/cpa* en muestras de excrementos de aves a un nivel de 0,5 ya muestra rastros de mucosa intestinal congestionada.

En consecuencia, la presente divulgación también proporciona un procedimiento para detectar enteritis necrótica, comprendiendo el procedimiento

- a) recolectar una muestra aviar
- b) determinar la cantidad de genes marcadores *netB* y *cpa* en esta muestra aviar, y
- c) determinar la relación de genes marcadores *netB/cpa* en las muestras aviares,

en el que una relación *netB/cpa* superior a 0,5 constituye una indicación de enteritis necrótica.

Además, la presente divulgación también proporciona nuevos cebadores y sondas de PCR adecuados para detectar y/o cuantificar los genes marcadores *netB* y *cpa* presentes en los excrementos de animales infectados con enteritis necrótica. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "sonda (PCR)" se refiere a una secuencia de oligonucleótidos que aumenta la especificidad de la PCR cuantitativa.

Los cebadores y las sondas de oligonucleótidos que se describen a continuación resultaron ser particularmente eficaces. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en

- a) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 3;
- b) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 4;
- c) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 5;
- d) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 6;
- e) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 7;
- f) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 8;
- g) oligonucleótidos que son complementarios a los oligonucleótidos según (a) a (f);
- h) oligonucleótidos que comprenden uno cualquiera de los oligonucleótidos según (a) a (g) y están alargados en no más de 5 pares de bases en comparación con los oligonucleótidos según (a) a (g).

De los mismos, el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 3 es un cebador de PCR (directo) para detectar *netB*. El polinucleótido representado en SEQ ID NO: 4 es un cebador de PCR (inverso) para detectar *netB*. El polinucleótido representado en SEQ ID NO: 5 es una sonda de PCR para detectar *netB*.

Además, el polinucleótido representado en la SEQ ID NO: 6 es un cebador de PCR (directo) para detectar *cpa*. El polinucleótido representado en SEQ ID NO: 7 es un cebador de PCR (inverso) para detectar *cpa*. El polinucleótido representado en SEQ ID NO: 8 es una sonda de PCR para detectar *cpa*.

Estos oligonucleótidos se utilizan preferentemente como cebadores y/o sondas en uno de los procedimientos descritos anteriormente para detectar enteritis necrótica.

En consecuencia, los oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en

a) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 3;

b) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 4;

c) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 5;

d) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 6;

e) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 7;

f) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 8;

g) oligonucleótidos que son complementarios a los oligonucleótidos según (a) a (f);

h) oligonucleótidos que comprenden uno cualquiera de los oligonucleótidos según (a) a (g) y están alargados en no más de 5 pares de bases en comparación con los oligonucleótidos según (a) a (g);

se utilizan en el procedimiento descrito anteriormente como cebador de PCR y/o como sonda de PCR.

La presente divulgación también proporciona un kit de diagnóstico para determinar si una población aviar, tal como una manada de aves, padece enteritis necrótica (subclínica) o no. Dicho kit comprende un conjunto de oligonucleótidos para amplificar y/o cuantificar al menos un polinucleótido que codifica al menos uno de los genes marcadores *netB* y/o *cpa*. Preferentemente, el kit de diagnóstico comprende cebadores y sondas de PCR tanto para *netB* como para *cpa*. El kit puede comprender uno o más oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con uno o más de los polinucleótidos que se muestran en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8; oligonucleótidos que son complementarios a los oligonucleótidos según SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8; oligonucleótidos que comprenden cualquiera de los oligonucleótidos mencionados anteriormente y que están alargados en no más de 5 pares de bases en comparación con los oligonucleótidos según SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y/o SEQ ID NO: 8. Preferentemente, el kit comprende al menos dos cebadores o al menos cuatro cebadores. Es particularmente preferido un kit que comprende dos cebadores y una sonda o un kit que comprende cebadores y dos sondas. El kit puede comprender además soluciones tampón, tales como tampón de PCR; sales de magnesio; trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP). El kit también puede incluir elementos tales como tubos de recogida de muestras, reactivos para aislar los ácidos nucleicos y/o instrucciones para su uso.

Además de lo anterior, los presentes inventores han descubierto inesperadamente que un mayor nivel de gen marcador *netB*, homólogos y fragmentos del mismo, en comparación con un control no infectado y un aumento en el nivel de *netB* con el tiempo, respectivamente, es una indicación de enteritis necrótica.

En consecuencia, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento para detectar enteritis necrótica aviar, comprendiendo el procedimiento

a) recolectar muestras de excrementos de un ave específica o de una población aviar específica en puntos temporales consecutivos; y

b) realizar un seguimiento del nivel del gen marcador *netB* y/o homólogos y fragmentos del mismo en estas muestras;

en el que un aumento en el nivel del gen marcador constituye una indicación de enteritis necrótica aviar.

En un aspecto preferido del procedimiento mencionado anteriormente, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento para detectar enteritis necrótica aviar, comprendiendo el procedimiento

a) recolectar muestras de excrementos de un ave específica o de una población aviar específica en puntos temporales consecutivos; y

b) realizar un seguimiento del nivel del gen marcador *netB* en estas muestras;

en el que un aumento en el nivel de *netB* constituye un indicio de enteritis necrótica aviar.

En ese sentido y de acuerdo con el entendimiento común, se debe considerar relevante un aumento de alrededor de 0,2 a 0,3 log (es decir, factor dos a cinco).

Los inventores han descubierto que una cantidad de *netB* de al menos 10^7 copias/g de heces constituye un indicio de enteritis necrótica.

En consecuencia, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento para detectar enteritis necrótica aviar, comprendiendo el procedimiento

a) recolectar muestras de excrementos de un ave específica o de una población aviar específica en puntos temporales consecutivos; y

b) realizar un seguimiento del nivel del gen marcador *netB* en estas muestras;

en el que una cantidad de *netB* de al menos 10^7 copias/g de heces constituye un indicio de enteritis necrótica.

Los procedimientos anteriores son adecuados para detectar estados tanto clínicos como subclínicos/latentes de enteritis necrótica.

Sorprendentemente, los inventores también han descubierto que la cantidad del gen marcador *netB* se correlaciona con la magnitud de las lesiones intestinales del sujeto aviar correspondiente y, por tanto, con el grado de enteritis necrótica. En consecuencia, la presente divulgación también se refiere a un procedimiento para determinar el grado de enteritis necrótica aviar, comprendiendo el procedimiento determinar la cantidad de gen marcador *netB* y/o homólogos y fragmentos del mismo, en muestras de excrementos aviares, en el que la cantidad de dicho gen marcador indica el grado de enteritis necrótica.

En los procedimientos anteriores, los cebadores y sondas de oligonucleótidos descritos a continuación resultaron ser particularmente eficaces.

En consecuencia, los oligonucleótidos seleccionados del grupo que consiste en

a) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO:3;

b) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 4;

c) oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con el polinucleótido representado en SEQ ID NO: 5;

d) oligonucleótidos que son complementarios a los oligonucleótidos (a) a (c);

e) oligonucleótidos que comprenden uno cualquiera de los oligonucleótidos según (a) a (d) y están alargados en no más de 5 pares de bases en comparación con los oligonucleótidos según (a) a (d);

pueden utilizarse en uno de los procedimientos descritos anteriormente para detectar enteritis necrótica aviar como cebador de PCR y/o como sonda de PCR para detectar *netB*.

El polinucleótido tal como se representa en SEQ ID NO: 3 es un cebador de PCR (directo) para detectar *netB*. El polinucleótido representado en SEQ ID NO: 4 es un cebador de PCR (inverso) para detectar *netB*. El polinucleótido representado en SEQ ID NO: 5 es una sonda de PCR para detectar *netB*.

La presente divulgación proporciona además un kit de diagnóstico para determinar si una población aviar, tal como una bandada de aves, padece enteritis necrótica (subclínica) o no. Dicho kit comprende un conjunto de oligonucleótidos para amplificar y/o cuantificar el polinucleótido que codifica el gen marcador *netB*. En una forma de realización preferida, el kit comprende uno o más oligonucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferentemente al menos el 85, 90 o 95%, de la forma más preferida el 100%, con uno o más de los polinucleótidos tal como se representan en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:5; oligonucleótidos que son complementarios a los oligonucleótidos según SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:5; oligonucleótidos que comprenden cualquiera de los oligonucleótidos mencionados anteriormente y que están alargados no más de 5 pares de bases en comparación con los oligonucleótidos según SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:5. Preferentemente, el kit comprende dos cebadores. Se prefiere particularmente un kit que comprende dos cebadores y una sonda. El kit puede comprender además soluciones tampón, tales como tampón de PCR; sales de magnesio;

trifosfatos de desoxinucleótidos (dNTP). El kit también puede incluir elementos tales como tubos de recogida de muestras, reactivos para aislar los ácidos nucleicos y/o instrucciones para su uso.

La presente invención proporciona los procedimientos no invasivos descritos anteriormente para detectar enteritis necrótica aviar y para determinar el grado de enteritis necrótica que se pueden realizar *ante mortem*. Esto permite al granjero tratar eficazmente a la población aviar que padece enteritis necrótica, si es necesario, posteriormente, después de haber realizado el ensayo mencionado anteriormente. Como alternativa o adicionalmente, el agricultor también puede administrar sustancias promotoras de la salud, tales como aditivos zootécnicos para piensos.

Preferentemente, el agente terapéutico o la sustancia promotora de la salud se selecciona del grupo que consiste en agentes antibióticos, agentes probióticos, agentes prebióticos, ácidos orgánicos/grasos, bacteriófagos y enzimas bacteriolíticas.

De acuerdo con ello, la presente divulgación también se refiere a agentes antibióticos para su uso en el tratamiento de la enteritis necrótica, en los que la enteritis necrótica se detecta o se evalúa realizando uno de los procedimientos indicados anteriormente. Además, la presente divulgación se refiere al uso de agentes probióticos, agentes prebióticos, ácidos orgánicos/grasos, bacteriófagos y enzimas bacteriolíticas para mejorar el estado de salud de un animal o una población animal.

Las aplicaciones de los procedimientos según la invención son, por ejemplo, (i) ayudar en el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades inducidas por *C. perfringens*, tales como enteritis necrótica aviar, (ii) realizar un seguimiento del progreso o de la recurrencia de estas enfermedades, (iii) ayudar en la evaluación de la eficacia del tratamiento para una población animal en tratamiento o para la que se contempla el tratamiento, o (iv) controlar la eficacia (terapéutica) de la vacunación contra enfermedades inducidas por *C. perfringens*.

Las aplicaciones de la invención en particular ayudan a evitar pérdidas en el rendimiento animal, tal como el aumento de peso y la conversión alimenticia.

A continuación, la invención se ilustra mediante ejemplos no limitantes y formas de realización de ejemplo.

Ejemplos

1. Modelo *in vivo*

Se utilizó un modelo subclínico *in vivo* para enteritis necrótica. En este modelo, se agruparon pollos de engorde Ross 308 (hembras y machos) a 27 aves por grupo. Se alimentaron con una dieta a base de trigo/centeno (43%/7,5%), con harina de soja como fuente de proteína hasta el día 16. A partir del día 17, la harina de soja se reemplazó por harina de pescado (30%) como fuente de proteína. Los días 4 y 9, se inoculó a los pollos de engorde por vía oral Poulvac Bursa Plus (Zoetis) como inmunosupresor. Los días 14 y 16, se inoculó a los pollos de engorde por vía oral una dosis diez veces mayor de Hipracox.

Las aves de 5 grupos (P.A - P.E) se desafiaron tres veces al día por vía oral con aproximadamente 4×10^8 ufc de bacterias *C. perfringens* (cultivo logarítmico tardío) *netB*-positivas, patógenas (*Cp56*) durante dos días consecutivos (día 18 y 19). Dos grupos de aves (P.F y P.G) se desafiaron solo una vez al día, para inducir lesiones necróticas más leves que los grupos anteriores desafiados tres veces al día.

Los pollos se desafiaron durante dos días consecutivos. Todos los animales se sacrificaron el día 20. Las lesiones intestinales en el intestino delgado (duodeno a íleon) se puntuaron de la forma siguiente: 0 = sin lesiones macroscópicas; 1 = mucosa intestinal congestionada; 2 = pequeña necrosis o ulceración focal (1-5 focos); 3 = necrosis o ulceración focal (6-15 focos); 4 = necrosis o ulceración focal (16 o más focos); 5 = parches de necrosis de 2-3 cm de largo; 6 = necrosis difusa típica de casos de campo. Las aves de control no infectadas se trataron de la misma manera exceptuando la inoculación con *C. perfringens*. A estas aves de control se les inoculó medio de crecimiento bacteriano estéril (caldo BHI).

Ninguna de las aves de control negativo, que recibieron medio bacteriano estéril (BHI) en lugar del cultivo de *C. perfringens* patógeno desarrolló enteritis necrótica. También las aves desafiadas con una cepa no patógena de *C. perfringens* se encontraban desprovistas de lesiones necróticas. En los otros grupos, desafiados con patógenos *Cp56*, la mayor parte de las aves desarrollaron enteritis necrótica, mostrando una gran cantidad de aves lesiones graves.

Resumen del modelo *in vivo*:

	D4	D9	D14	D16	D17	D18	D19	D20
Poultac Bursa Plus	X	X						
Hipracox x10			X	X				
Pienso + harina de pescado					X	X	X	
Inoculación de <i>C. perfringens</i>						X	X	
Puntuación								X

Se recolectaron muestras cloacales frescas (es decir, muestras de animales individuales) inmediatamente después de su muerte y se congelaron instantáneamente en N₂ líquido antes de su almacenamiento a -80 °C.

5 Muestras cloacales de animales individualizados:

- Aves infectadas (diferentes puntuaciones de lesiones)

- Grupos de control no infectados

10

- Aves a las que se inoculó *C. perfringens netB*-negativo

Se recolectaron muestras del lecho (= excrementos fecales mezclados en el corral, es decir, muestras combinadas de la manada de aves) de cada grupo utilizando el procedimiento de cubrezapatos (solo el día 19) y usando pinzas para lecho en 5 lugares diferentes del corral desde el día anterior a la inoculación (día 17) hasta el día 19.

15

Tipos y cantidades de muestras recolectadas:

MUESTRA		CANTIDAD DE MUESTRAS
MUESTRAS CLOCALES	No infectada	10
	Infectadas con <i>C. perfringens netB</i> -negativo	10
	Puntuación 0	10
	Puntuación 2	10
	Puntuación 3 o 4	10
	Puntuación 5 o 6	8
	No infectada (BHI)	
MUESTRAS DEL LECHO	Antes de la inoculación	1 pinza para lecho
	Después de la primera inoculación	1 pinza para lecho
	Después de la segunda inoculación	1 pinza para lecho + 1 muestra de cubrezapatos
	Infectadas con <i>C. perfringens</i> no patógeno	
	Antes de la inoculación	2 pinzas para lecho
	Después de la primera inoculación	2 pinzas para lecho
	Después de la segunda inoculación	2 pinzas para lecho + 2 muestras de cubrezapatos
	Infectadas con <i>C. perfringens netB</i> -positivo	
	Antes de la inoculación	7 pinzas para lecho
	Después de la primera inoculación	7 pinzas para lecho
	Después de la segunda inoculación	7 pinzas para lecho + 6 muestras de cubrezapatos

20 Las muestras de cubrezapatos se recolectaron solo el día 19. Las muestras del lecho se recolectaron del día 17 hasta el día 19. Las muestras se homogeneizaron y se dividieron en tres porciones.

2. Extracción y cuantificación de ADN

25 Se extrajo ADN de las muestras utilizando el procedimiento CTAB. Por lo tanto, se utilizaron como material de partida 100 mg de material cloacal y 200 mg de muestra de pinza para lecho o de cubrezapatos. El ADN total se eluyó en 100 µl de agua. La concentración de ADN se determinó con un espectrofotómetro Nanodrop ND 1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, Estados Unidos) y se ajustó a una concentración final de 50 ng/µl.

30 La qPCR se realizó usando la mezcla maestra SYBR-green 2x (Bioline, Bruselas, Bélgica) en un sistema Bio-Rad CFX-384. Cada reacción se realizó por triplicado en una mezcla de reacción total de 12 µl utilizando 2 µl de la muestra

de ADN y una concentración final de cebador qPCR 0,5 µM. Las condiciones de qPCR utilizadas fueron las mismas para ambos genes: 1 ciclo de 95 °C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 30 s, 60 °C durante 30 s, y aumento gradual de la temperatura de 65 °C a 95 °C (a 10 s/0,5 °C). Se analizaron los datos de la curva de fusión para confirmar la especificidad de la reacción. Para la construcción de la curva patrón, se generó el producto de PCR utilizando los cebadores PCR patrón que se enumeran a continuación y el ADN de la cepa CP56 de *C. perfringens*. Después de la purificación (MSB Spin PCRapace, Stratec Molecular, Berlín, Alemania) y la determinación de la concentración de ADN. La concentración del patrón de ADNbc lineal se ajustó a 1×10^7 hasta 1×10^1 copias por µl, variando cada etapa en 10 veces. Los números de copias de las muestras se determinaron leyendo la serie patrón con los valores Ct de las muestras.

El límite de detección de la técnica qPCR depende de la concentración de ADN obtenida después de la extracción de CTAB y fue de aproximadamente 10^5 copias genómicas/g de material.

Cebadores utilizados en el ensayo de PCR:

PCR

<i>cpa</i>	AGT CTA CGC TTG GGA TGG AA	(directo)	SEQ ID NO:9
	TTT CCT GGG TTG TTC ATT TC	(inverso)	SEQ ID NO:10
<i>netB</i>	TGA TAC CGC TTC ACA TAA AGG T	(directo)	SEQ ID NO:11
	ACC GTC CTT AGT CTC AAC AAA T	(inverso)	SEQ ID NO:12

qPCR

<i>cpa</i>	GTT GAT AGC GCA GGA CAT GTT AAG	(directo)	SEQ ID NO:13
	CAT GTA GTC ATC TGT TCC AGC ATC	(inverso)	SEQ ID NO:14
<i>netB</i>	TCA ATT GGT TAT TCT ATA GGC GGT A	(directo)	SEQ ID NO:15
	ATA TGA AGC ATT TAT TCC AGC ACC A	(inverso)	SEQ ID NO:16

3. Ensayo conjunto: correlación de la cantidad de genes marcadores en muestras cloacales de animales individualizados

En estos ejemplos, se investigaron las muestras cloacales mencionadas anteriormente.

En el día de la necropsia, el gen de la alfa-toxina (*cpa*) estuvo presente en las muestras cloacales de todos los grupos (tanto aves no infectadas como infectadas) y también el gen *netB* estaba presente en todas las muestras cloacales.

3.1 Correlación de la cantidad de *netB* con la puntuación de lesión

Solo en muestras cloacales de aves desafiadas con una cepa de *C. perfringens*, patógena, *netB* positiva, la señal de *netB* media es superior a 10^7 copias/g de heces.

	<i>netB</i> [copias/g muestra]	<i>netB</i> [logaritmo de copias/g de muestra]	desviación estándar
No infectado (BHI)	3,16E + 06	6,50	0,37
Cp no-pat.	3,92E + 06	6,59	0,32
Puntuación 0	1,16E + 08	8,06	0,54
Puntuación 2	4,96E + 08	8,70	0,73
Puntuación 3-4	7,18E + 08	8,86	0,79
Puntuación 5-6	4,83E + 09	9,68	0,64

Este ejemplo muestra que la cantidad de gen *netB* en las muestras analizadas se correlaciona directamente con la puntuación de la lesión intestinal del ave analizada, es decir, con el grado de enteritis necrótica del ave infectada.

La correlación entre las puntuaciones de lesión de las aves infectadas con la cepa de *C. perfringens* patógena y la cantidad de genes (*netB/cpa*) presente en las heces se calculó mediante correlación de Spearman. El valor r de Spearman puede variar de 0 a 1: $r = 1 \rightarrow$ correlación perfecta, $r = 0 \rightarrow$ sin correlación. La presencia de todos los genes analizados muestra una correlación con la gravedad de la enfermedad, siendo la correlación más alta con el gen *netB*.

	copias/g de muestra		logaritmo de copias/g de muestra		desviación estándar	
	<i>netB</i>	<i>cpa</i>	<i>netB</i>	<i>cpa</i>	<i>netB</i>	<i>cpa</i>
No infectado (BHI)	3,16E + 06	3,72E + 08	6,50	8,57	0,37	0,87
Cp no pat.	3,92E + 06	6,59E + 07	6,59	7,82	0,32	0,95
Puntuación 0	1,16E + 08	2,81E + 08	8,06	8,45	0,54	0,48
Puntuación 2	4,96E + 08	4,44E + 08	8,70	8,65	0,73	0,77
Puntuación 3-4	7,18E + 08	1,33E + 09	8,86	9,12	0,79	0,62
Puntuación 5-6	4,83E + 09	1,93E + 09	9,68	9,29	0,64	0,75

Cálculo de Spearman:

Parámetro	<i>cpa</i>	<i>netB</i>
Número de pares XY	38	38
<i>r</i> de Spearman	0,4195	0,6110
95% de intervalo de confianza	0,1055 a 0,6574	0,3534 a 0,7825
Valor P (de dos colas)	0,0088	P < 0,0001
Resumen del valor P	**	***
¿Valor P exacto o aproximado?	Aproximación gaussiana	Aproximación gaussiana
¿Es la correlación significativa? (alfa = 0,05)	Sí	Sí

- 5 La correlación de Spearman proporciona una prueba matemática sobre la correlación entre la cantidad de *netB* en la muestra cloacal y el grado de enteritis necrótica.

3.2 Correlación de la relación *netB/cpa* con la puntuación de la lesión

- 10 Se investigó la relación de gen *netB* frente al gen *cpa* en las muestras cloacales de aves no infectadas (BHI), aves desafiadas con la cepa no patógena (no pat.) y aves desafiadas con la cepa de *C. perfringens* patógena.

Las aves mostraron diferentes grados de gravedad de la enfermedad (puntuación de 0 a puntuación de 5 a 6):

	Relación media <i>netB/cpa</i>
No infectado (BHI)	0,04
Cp no pat.	0,09
Puntuación 0	0,83
Puntuación 2	1,85
Puntuación 3-4	1,27
Puntuación 5-6	2,69

- 15 4. Ensayos combinados: control de la cantidad de genes marcadores en muestras de excrementos de la población aviar a lo largo del tiempo.

En estos ejemplos, se investigaron las muestras del lecho indicadas anteriormente.

20

4.1 Seguimiento de la cantidad de *netB* a lo largo del tiempo

Se descubrió que la cantidad de gen *netB* en las muestras del lecho aumentaron significativamente a partir del día siguiente al día de la inoculación (día 18) con la cepa de *C. perfringens* patógena:

25

	<i>netB</i>		
	copias/g muestra	logaritmo de copias de muestra/g	desviación estándar
No infectado (BHI) - día 17	1,97E + 05	5,29	
No infectado (BHI) - día 18	2,53E + 05	5,40	
No infectado (BHI) - día 19	1,12E + 05	5,05	
No infectado (BHI) - día 19 - BS	8,46E + 04	4,93	
Cp no pat.- día 17	6,92E + 04	4,84	0,09
Cp no pat.- día 18	4,17E + 04	4,62	0,05
Cp no pat.- día 19	8,01E + 04	4,90	
Cp no pat.- día 19 - BS	4,16E + 04	4,62	0,39
Grupo EN - día 17	3,21E + 05	5,51	0,93
Grupo EN - día 18	7,03E + 07	7,85	0,74
Grupo EN - día 19	1,11 E + 08	8,05	0,24
Grupo EN - día 19 - BS	2,63E + 08	8,42	0,95

4.2 Seguimiento de la relación *netB/cpa* a lo largo del tiempo

- 5 Se descubrió que la relación de gen *netB* con respecto a gen *cpa* en las muestras del lecho recolectadas en los días 17 a 19 aumentó significativamente a partir del día siguiente al día de la inoculación (día 18) con la cepa de *C. perfringens* patógena:

	<i>netB/cpa</i>
No infectado (BHI) - día 17	0,00
No infectado (BHI) - día 18	0,01
No infectado (BHI) - día 19	0,00
No infectado (BHI) - día 19 - BS	0,00
Cp no pat.- día 17	0,00
Cp no pat.- día 18	0,00
Cp no pat.- día 19	0,00
Cp no pat.- día 19 - BS	0,00
Grupo EN - día 17	0,08
Grupo EN - día 18	1,27
Grupo EN - día 19	2,45
Grupo EN - día 19 - BS	2,63

- 10 Los experimentos anteriores muestran que un aumento en la cantidad de gen *netB* y en la relación de genes *netB/cpa*, respectivamente, en muestras combinadas de excrementos de animales recolectadas en momentos determinados consecutivos, se correlaciona con el desarrollo o la progresión de la enteritis necrótica. Con ello, se demuestra que los procedimientos de la presente invención permiten una evaluación del estado de salud de una manada de animales completa con respecto a enfermedades inducidas por *C. perfringens*.

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento de detección de enfermedades inducidas por *C. perfringens* en una bandada de aves, comprendiendo el procedimiento:

a) recolectar material de muestra de la bandada de aves en momentos determinados consecutivos;

b) determinar la cantidad de un primer marcador y un segundo marcador contenidos en el material de muestra y

c) determinar la relación del primer marcador con respecto al segundo marcador contenidos en el material de muestra;

en el que el primer marcador comprende una secuencia de polinucleótidos que es específica para las subespecies de *C. perfringens* que inducen la enfermedad diana;

y el segundo marcador comprende un polinucleótido que es específico para la especie *C. perfringens*; y

en el que un aumento en la relación del primer marcador con respecto al segundo marcador en el material de muestra analizado a lo largo del tiempo es una indicación de la enfermedad diana.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el primer marcador es un gen marcador que codifica una toxina específica o una isla de patogenicidad.

3. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer marcador está ubicado en un plásmido de toxina de *C. perfringens* y el segundo marcador está ubicado en el cromosoma de *C. perfringens*.

4. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el primer marcador se selecciona del grupo que consiste en *cpe*, toxina beta (*cpb*), toxina beta2 (*cpb2*), toxina épsilon (*etx*), *netF* y *netB* y homólogos y fragmentos de los mismos.

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el segundo marcador es *cpa*.

6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de muestra es una muestra combinada seleccionada del grupo que consiste en muestras de polvo, muestras del lecho, muestras de estiércol líquido, muestras de pelo, muestras de plumas, muestras de piel y muestras de excrementos corporales y soluciones o suspensiones de los mismos.

7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material de muestra son heces combinadas.

8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la masa de la muestra es de 0,1 g a 20 g.

9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que las muestras se toman y se analizan semanalmente, diariamente o cada hora, preferentemente en días consecutivos.

10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que los genes marcadores contenidos en el material de muestra se detectan y se cuantifican mediante PCR, preferentemente mediante qPCR.

11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad inducida por *C. perfringens* se encuentra en estado subclínico o latente.

12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la enfermedad inducida por *C. perfringens* es enteritis necrótica, preferentemente en estado subclínico o latente.