

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 884 215**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/689 (2008.01)

C12Q 1/6883 (2008.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.02.2016** **E 18173960 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.07.2021** **EP 3412779**

54 Título: **Método de detección de enteritis necrótica aviar**

30 Prioridad:

06.03.2015 US 201562129293 P

29.06.2015 EP 15174270

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

10.12.2021

73 Titular/es:

EVONIK DEGUSSA GMBH (100.0%)

Rellinghauser Straße 1-11

45128 Essen, DE

72 Inventor/es:

IGWE, EMEKA IGNATIUS;

WALLMEIER, HOLGER;

PELZER, STEFAN;

FLÜGEL, MONIKA y

BEKEL, THOMAS

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 884 215 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de detección de enteritis necrótica aviar

La presente invención se refiere a un método de detección de enteritis necrótica aviar subclínica analizando excrementos fecales, según el alcance de las reivindicaciones adjuntas. Se desvelan además nuevos marcadores que se ha identificado que son adecuados para la detección de enteritis necrótica aviar y/o infección aviar que implica a *Clostridium perfringens*.

Clostridium perfringens es el principal agente causal de la enteritis necrótica (EN) aviar, una enfermedad entérica de las aves de corral que fue descrita por primera vez en 1961. La EN en pollos se manifiesta como una enterotoxemia aguda o crónica. La enfermedad aguda produce niveles significativos de mortalidad debido al desarrollo de lesiones necróticas en la pared del intestino, mientras que la enfermedad crónica conduce a una pérdida significativa de productividad y bienestar. Se ha estimado que la enfermedad causa daños de varios billones de dólares estadounidenses al año a la industria de las aves de corral.

C. perfringens se encuentra comúnmente en el tubo gastrointestinal de las aves de corral, sin embargo, la aparición de la enteritis necrótica es esporádica. *C. perfringens* es un anaerobio Gram-positivo, en forma de bacilo, formador de esporas, tolerante al oxígeno. Las cepas de *C. perfringens* se clasifican en cinco tipos de toxina (A, B, C, D y E), basándose en la producción de cuatro presuntas toxinas principales (alfa, beta, épsilon e iota). Mientras que el tipo A se recupera sistemáticamente de los intestinos de pollo, los otros tipos son menos comunes.

Estudios previos sobre la EN sugirieron que el principal factor de virulencia implicado en la enfermedad era secretado por las bacterias, que condujo a la propuesta de que una enzima fosfolipasa C, denominada alfa-toxina, era la principal toxina implicada en la patogénesis. Pero estudios recientes mostraron que la alfa-toxina no parece ser un factor de virulencia esencial, puesto que las cepas mutantes de alfa-toxina fueron capaces de causar EN, que cuestiona la función de la alfa-toxina en la enfermedad en general. En estudios más recientes, se ha sugerido que la novedosa toxina formadora de poros, netB, desempeña una función clave importante en el desarrollo de esta enfermedad.

Aparte de la mera asociación de los factores de virulencia en sí con la incidencia de EN, todavía existe una gran carga para mostrar la conexión mecánica entre estos factores y el establecimiento de la enfermedad en aves o animales de granja. Además, es extremadamente difícil relacionar la infección subclínica por EN con cualquiera de estos factores de virulencia, puesto que las aves carecen de signos que garanticen su examen antes del sacrificio. Por tanto, sigue siendo imprescindible la necesidad de un método de detección precoz de EN y, lo que es más importante, de las formas subclínicas de EN.

Tradicionalmente, el descubrimiento y la validación de biomarcadores de enfermedad requería el uso de tejido, ya fuera recién congelado, o más comúnmente, fijado en formol, incorporado en parafina. Esto ha sido especialmente cierto para los biomarcadores basados en ARNm, debido a que la degradación por RNasa del ARN libre hace que sea altamente problemática la traducción de biomarcadores basados en tejido en líquidos biológicos, tales como sangre o muestras fecales/cecales. Sin embargo, la monitorización de biomarcadores de tejido es, debido a su naturaleza invasiva, lenta y poco práctica, cuando participan grandes números de muestras como para animales de granja.

Se han descrito métodos no invasivos, tales como la medición de los parámetros de la sangre para la detección de enfermedades en las aves (Chuku et al., 2012; Aade et al., 2012; Saleem, 2012). Gulbeena Saleem (2012) sugiere como un enfoque alternativo para la determinación de EN subclínica la medición de los niveles de proteínas de la fase aguda como ceruplasmina, PIT54 y ovotransferrina en respuesta a la exposición a *C. perfringens* en suero sanguíneo de los pollos. Resultó que solo pareció que la ceruplasmina era una proteína de la fase aguda adecuada que se correlacionaba con la aparición de EN subclínica. A pesar de esto, esto también puede ser visto como un problema, puesto que la ceruplasmina no es un marcador específico de EN, sino de enfermedades provocadas por otros patógenos bacterianos (colibacilosis en pollo, Piercy, 1979; infección por salmonella en gallinas ponedoras comerciales, García et al., 2009). El documento de patente WO2008/148166 desvela un método que se relaciona con la determinación de si un sujeto aviar se ha expuesto o no a *Clostridium perfringens* detectando un polinucleótido que codifica NetB en una muestra del sujeto.

Así los inventores de la presente solicitud se preguntaron si se podrían aplicar métodos no invasivos alternativos para determinar enteritis necrótica aviar subclínica.

Se encontró sorprendentemente que las muestras de sangre aviar y de excrementos aviares, en particular excrementos fecales y cecales, presentaban de hecho una alteración en el contenido de ARN detectable en función de la presencia de enteritis necrótica. Además de un aumento de miARN de hospedador específicos debido a la infección por *C. perfringens*, sorprendentemente también se pudieron detectar secuencias de ARNm de *C. perfringens* en la sangre aviar y los excrementos aviares, que se clasifican, por tanto, como factores de virulencia específicos de la enfermedad y, por consiguiente, como biomarcadores adecuados indicativos de enteritis necrótica.

Resultó que la aparición de marcadores indicativos de enteritis necrótica es específica de la muestra, es decir, la cantidad detectable de los diferentes marcadores depende del tipo de muestra. Así, se encontró que en excrementos fecales el mejor marcador es la región SAM, seguido por ARNcp, la región netB, la región virX, la región de colA, la

región de dedos de cinc swim y la región CPE0956. Al contrario, en excrementos cecales, el mejor marcador también es la región SAM, pero va seguido por la región de dedos de cinc swim, ARNcp, mir206, la región virX, la región netB, la región CPE0956 y la región de colA.

Además, en muestras de sangre, el mejor marcador es mir16, seguido por mir155 y mir24.

- 5 Así, fue un primer objeto proporcionar un método rápido y fiable, preferentemente no invasivo, para la determinación de enteritis necrótica aviar, en particular enteritis necrótica aviar subclínica, preferentemente en aves de corral, más preferentemente en pollos y/o para identificar sujetos aviares que padecen enteritis necrótica.

Fue un objeto adicional identificar marcadores adecuados, preferentemente marcadores específicos de enfermedad, que se pudieran emplear en dicho método.

- 10 Así, un primer objeto de la presente divulgación es un método de detección de enteritis necrótica aviar, en particular enteritis necrótica aviar subclínica, comprendiendo el método determinar la presencia y/o el nivel de al menos un marcador indicativo de enteritis necrótica en excrementos fecales aviares, preferentemente en microvesículas aisladas de excrementos fecales aviares, en donde la presencia y/o un aumento del nivel de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de enteritis necrótica y en donde el marcador se selecciona preferentemente de

- 15 a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1,
- 20 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 3,
- 25 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 4;
- 30 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 5;
- 35 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 7;
- 40 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 8;
- g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 9;
- h) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (g);
- 45 i) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (h);
- j) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (i).

En este método, las secuencias se seleccionan preferentemente del siguiente grupo:

- 50 a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60 o 100, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferentemente 460 a 560, de SEQ ID NO: 1,

- b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60 o 90, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 600 a 1000, en particular 670 a 760, de SEQ ID NO: 3,
- 5 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100 o 140, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 60 a 240, en particular 80 a 220, de SEQ ID NO: 4;
- 10 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos según la posición 1300 a 1800, en particular 1400 a 1700, de SEQ ID NO: 5;
- 15 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150 o 180, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 591, en particular 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;
- 20 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 240 a 540, en particular 300 a 540 de SEQ ID NO: 8;
- g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150 o 160, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 12 a 418, en particular 240 a 400 de SEQ ID NO: 9;
- 25 h) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (g);
- i) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (h);
- j) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (i).
- Así, un objeto adicional de la presente divulgación es un método de detección de enteritis necrótica aviar, en particular enteritis necrótica aviar subclínica, comprendiendo el método determinar la presencia y/o el nivel de al menos un marcador indicativo de enteritis necrótica en excrementos cecales aviares, en particular en microvesículas aisladas de excrementos cecales aviares, en donde la presencia y/o un aumento del nivel de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de enteritis necrótica y en donde el marcador se selecciona preferentemente de
- 30 a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1,
- 35 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 3,
- 40 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 4;
- 45 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 5;
- 50 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 7;

- f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 8;
- 5 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 9;
- 10 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 13;
- i) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (h);
- j) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (i);
- 15 k) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (j).

En este método, las secuencias se seleccionan preferentemente del siguiente grupo:

- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60 o 100, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferentemente 460 a 560, de SEQ ID NO: 1,
- 20 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60 o 90, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 600 a 1000, en particular 670 a 760, de SEQ ID NO: 3,
- 25 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100 o 140, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 60 a 240, en particular 80 a 220, de SEQ ID NO: 4;
- 30 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos según la posición 1300 a 1800, en particular 1400 a 1700, de SEQ ID NO: 5;
- e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150 o 180, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 591, en particular 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;
- 35 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 240 a 540, en particular 300 a 540 de SEQ ID NO: 8;
- 40 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150 o 160, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 12 a 418, en particular 240 a 400 de SEQ ID NO: 9;
- 45 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 45 a 66 de SEQ ID NO: 13,
- i) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (h);
- 50 j) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (i);
- k) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (j).

Así, un objeto adicional de la presente divulgación también es un método de detección de enteritis necrótica aviar, en particular enteritis necrótica subclínica, comprendiendo el método determinar la presencia y/o el nivel de al menos un marcador indicativo de enteritis necrótica en sangre aviar, en particular en microvesículas aisladas de sangre aviar, en donde la presencia y/o un aumento del nivel de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de enteritis necrótica y en donde el al menos un marcador se selecciona preferentemente de

- 5 a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40, 60 o 80, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 10;
- 10 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 11;
- 15 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 12;
- d) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (c);
- e) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (d);
- 20 f) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (e).

En este método, las secuencias se seleccionan preferentemente del siguiente grupo:

- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 14 a 25 de SEQ ID NO: 10;
- 25 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 44 a 65 de SEQ ID NO: 11;
- 30 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 3 a 24 de SEQ ID NO: 12;
- d) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (c);
- 35 e) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (d);
- f) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (e).

Un objeto adicional de la presente divulgación también es un método de detección de enteritis necrótica aviar, en particular enteritis necrótica aviar subclínica, comprendiendo el método aislar microvesículas de una muestra aviar, en particular de un líquido corporal aviar o un excremento aviar, y posteriormente determinar la presencia y/o el nivel de al menos un marcador indicativo de enteritis necrótica en estas microvesículas, en donde la presencia y/o un aumento del nivel de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de enteritis necrótica.

- Como se ha desvelado antes, el marcador indicativo de la enteritis necrótica se selecciona preferentemente de las siguientes secuencias de *Clostridium perfringens* y homólogos y fragmentos de las mismas: la región SAM (SEQ ID NO: 1), la región de dedos de cinc swim (SEQ ID NO: 3), el ARNcp (SEQ ID NO: 4), la región de colA (SEQ ID NO: 5), la región CPE0956 (SEQ ID NO: 7), la región netB (SEQ ID NO: 8), la región virX (SEQ ID NO: 9) y la región TpeL (SEQ ID NO: 16); así como de las siguientes secuencias aviares y homólogos y fragmentos de los mismos: mir-16 (SEQ ID NO: 10), mir-24 (SEQ ID NO: 11), mir-155 (SEQ ID NO: 12), mir-206 (SEQ ID NO: 13).
- 45

Por lo tanto, también es un objeto adicional de la presente divulgación un método de detección de enteritis necrótica aviar, en particular enteritis necrótica aviar subclínica, comprendiendo el método aislar microvesículas de una muestra aviar, en particular de líquidos corporales aviares o excrementos aviares, y posteriormente determinar la presencia y/o el nivel de al menos un marcador indicativo de enteritis necrótica en estas microvesículas, en donde la presencia y/o un aumento del nivel de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de enteritis necrótica y en donde el marcador se selecciona del siguiente grupo ("Lista I"):

50

- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1;
- 5 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 3;
- 10 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 4;
- 15 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 5;
- 20 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 7;
- f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 8;
- 25 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 9;
- 30 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 16;
- 35 i) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40, 60 o 80, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 10;
- 40 j) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 11;
- k) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 12;
- 45 l) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 13;
- m) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (l);
- 50 n) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (m);
- o) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (n).

En este método, las secuencias se seleccionan preferentemente del siguiente grupo ("Lista II"):

- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferentemente 460 a 560, de SEQ ID NO: 1;
- 5 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 600 a 1000, en particular 670 a 760, de SEQ ID NO: 3;
- 10 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 60 a 240, en particular 80 a 220, de SEQ ID NO: 4;
- 15 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos según la posición 1300 a 1800, en particular 1400 a 1700, de (la secuencia como se representa in) SEQ ID NO: 5;
- 20 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 591, en particular 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;
- f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 240 a 540, en particular 300 a 540 de SEQ ID NO: 8;
- 25 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 12 a 418, en particular 240 a 400, de SEQ ID NO: 9;
- 30 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 673 a 5628 de SEQ ID NO: 16;
- 35 i) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 14 a 25 de SEQ ID NO: 10;
- 40 j) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 44 a 65 de SEQ ID NO: 11;
- k) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 3 a 24 de SEQ ID NO: 12;
- 45 l) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 45 a 66 de SEQ ID NO: 13;
- m) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (l);
- 50 n) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (m);
- o) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (n).

Más preferentemente, las secuencias se seleccionan del siguiente grupo ("Lista III"):

- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 460 a 560 de SEQ ID NO: 1,
- 5 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 670 a 760 de SEQ ID NO: 3,
- 10 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 80 a 220 de SEQ ID NO: 4;
- 15 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1400 a 1700 de SEQ ID NO: 5;
- 20 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;
- 25 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 300 a 540 de SEQ ID NO: 8;
- 30 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 240 a 400 de SEQ ID NO: 9;
- 35 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 673 a 5628 de SEQ ID NO: 16;
- 40 i) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 14 a 25 de SEQ ID NO: 10;
- j) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 44 a 65 de SEQ ID NO: 11;
- 45 k) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 3 a 24 de SEQ ID NO: 12;
- l) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 45 a 66 de SEQ ID NO: 13,
- m) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (l);
- 50 n) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (m);
- o) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (n).

En una realización preferida, se usan combinaciones de dichos polinucleótidos/marcadores, preferentemente combinaciones de al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de dichos marcadores, para detectar enteritis necrótica.

Otro objeto de la presente divulgación es un método de detección de infección asociada, en particular enteritis necrótica asociada, a *Clostridium perfringens*, comprendiendo el método aislar microvesículas de una muestra aviar, y posteriormente determinar la presencia y/o el nivel de al menos un marcador indicativo de la presencia de infección asociada, en particular enteritis necrótica asociada, a *Clostridium perfringens* en estas microvesículas, en donde la presencia y/o un aumento del nivel de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de la enfermedad, en particular enteritis necrótica. En este método, el al menos un marcador se selecciona preferentemente de los polinucleótidos de la Lista I, (a) a (h), así como de polinucleótidos (ADN y ARN) complementarios a las secuencias. Más preferentemente, el marcador se selecciona de los polinucleótidos de la Lista II, (a) a (h), así como de polinucleótidos (ADN y ARN) complementarios a las secuencias. Incluso más preferentemente, el marcador se selecciona de los polinucleótidos de la Lista III, (a) a (h), así como de polinucleótidos (ADN y ARN) complementarios a las secuencias.

Otro objeto de la presente divulgación es un método de detección de infección asociada, en particular enteritis necrótica asociada, a miARN aviar, comprendiendo el método aislar microvesículas de una muestra aviar, y posteriormente determinar la presencia y/o el nivel de infección asociada, en particular enteritis necrótica asociada, a miARN en estas microvesículas, en donde la presencia y/o un aumento del nivel de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de la enfermedad, en particular enteritis necrótica. En este método, el al menos un marcador se selecciona preferentemente de los polinucleótidos de la Lista I, (i) a (l), así como de polinucleótidos (ADN y ARN) complementarios a las secuencias. Más preferentemente, el marcador se selecciona de los polinucleótidos de la Lista II, (i) a (l), así como de polinucleótidos (ADN y ARN) complementarios a las secuencias. Incluso más preferentemente, el marcador se selecciona de los polinucleótidos de la Lista III, (i) a (l), así como de polinucleótidos (ADN y ARN) complementarios a las secuencias.

Como es sorprendente que la región SAM (SEQ ID NO: 1), la región de dedos de cinc swim (SEQ ID NO: 3), el ARNcp (SEQ ID NO: 4), la región CPE0956 (SEQ ID NO: 7), la región virX (SEQ ID NO: 9), así como mir-16 (SEQ ID NO: 10), mir-24 (SEQ ID NO: 11), mir-155 (SEQ ID NO: 12) y mir-206 (SEQ ID NO: 13), se puedan usar como marcadores para determinar enteritis necrótica aviar, en todos los casos, un objeto adicional es un método de detección de enteritis necrótica aviar, en particular enteritis necrótica aviar subclínica, en donde la detección de la enteritis necrótica se lleva a cabo detectando la presencia y/o la cantidad de al menos una de las siguientes secuencias ("Lista IV") en una muestra aviar, preferentemente en microvesículas de una muestra aviar, en particular en comparación con una muestra de control de un ave no infectada, en donde la presencia y/o un aumento de nivel de al menos una de las secuencias en comparación con un control no infectado es indicativo de enteritis necrótica:

a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1,

b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 3,

c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 4;

d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 7;

e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 9;

f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40, 60 o 80, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 10;

g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 11;

h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 12;

5 i) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 13;

j) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (i);

10 k) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (j);

l) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (k).

En este método, las secuencias se seleccionan preferentemente del siguiente grupo ("Lista V"):

15 a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferentemente 460 a 560, de SEQ ID NO: 1,

20 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 600 a 1000, en particular 670 a 760, de SEQ ID NO: 3,

c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 60 a 240, en particular 80 a 220, de SEQ ID NO: 4;

25 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 591, en particular 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;

30 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 12 a 418, en particular 240 a 400 de SEQ ID NO: 9;

35 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 14 a 25 de SEQ ID NO: 10;

40 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 44 a 65 de SEQ ID NO: 11;

h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 3 a 24 de SEQ ID NO: 12;

45 i) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 45 a 66 de SEQ ID NO: 13,

j) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (i);

50 k) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (j);

l) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (k).

Más preferentemente, las secuencias se seleccionan del siguiente grupo ("Lista VI"):

- 5 a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 460 a 560 de SEQ ID NO: 1,
- b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 670 a 760 de SEQ ID NO: 3,
- 10 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 80 a 220 de SEQ ID NO: 4;
- 15 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;
- 20 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 30 o 40, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 240 a 400 de SEQ ID NO: 9;
- 25 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 14 a 25 de SEQ ID NO: 10;
- g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 44 a 65 de SEQ ID NO: 11;
- 30 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 3 a 24 de SEQ ID NO: 12;
- 35 i) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 45 a 66 de SEQ ID NO: 13,
- j) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (i);
- k) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (j);
- 40 l) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (k).

En una realización preferida, se usan combinaciones de dichos polinucleótidos, preferentemente combinaciones de al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de dichos polinucleótidos, para detectar enteritis necrótica.

La muestra aviar puede ser una muestra de tejido, preferentemente una muestra intestinal, en particular una muestra duodenal o yeyunal.

- 45 Preferentemente, la muestra aviar se selecciona de líquidos corporales aviares y excrementos aviares y disoluciones y suspensiones de los mismos.

El líquido corporal aviar es preferentemente sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo.

El excremento aviar se selecciona preferentemente de excrementos fecales y cecales.

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

El sujeto aviar es preferentemente 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 ejemplares jóvenes. Este tipo de aves de corral también se denomina animales progenitores. Los animales progenitores preferidos son, por consiguiente, pollos de engorde progenitores, patos progenitores, pavos progenitores y gansos progenitores.

Las aves de corral también se pueden seleccionar de aves de corral exóticas y aves salvajes. Las aves de corral exóticas o aves salvajes preferidas son pavos reales, faisanes, perdices, gallinas de Guinea, codornices, urogallos, gallos lira, palomas y cisnes.

Las aves de corral preferidas adicionales son avestruces y loros.

Las aves de corral más preferidas son pollos.

Como se usa en el presente documento, el término "polinucleótidos" o "ácidos nucleicos" se refiere a ADN y ARN. Los polinucleótidos y ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios. No se ha desvelado antes el aislamiento de microvesículas de excrementos aviáres y su uso posterior para determinar una infección aviar, en particular infección aviar bacteriana, más particular enteritis necrótica.

Así, un objeto adicional desvelado en el presente documento es un método de detección de una infección aviar, en particular una infección aviar subclínica, preferentemente una infección aviar bacteriana, en particular una infección aviar bacteriana subclínica, más preferentemente enteritis necrótica, en particular enteritis necrótica subclínica, comprendiendo el método determinar la presencia y/o la cantidad de al menos un marcador indicativo de la enfermedad en microvesículas aisladas de excrementos aviáres, en particular de excrementos fecales o cecales, en donde la presencia y/o un aumento del nivel de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de la enfermedad. En este método, el al menos un marcador se selecciona preferentemente de cualquiera de los polinucleótidos que se desvelan en la Lista I, preferentemente que se desvela en la Lista II, más preferentemente que se desvela en la Lista III.

Un objeto adicional es un método de tratamiento de enteritis necrótica que comprende realizar el método de detección de enteritis necrótica como se describe antes y posteriormente administrar un agente terapéutico para el tratamiento de enteritis necrótica.

Un objeto adicional también es una matriz de nucleótidos para detectar enteritis necrótica aviar, en donde la matriz de nucleótidos comprende al menos un marcador, preferentemente al menos 2, 3, 4 o 5 marcadores, seleccionados de los polinucleótidos que se representan en la Lista IV, preferentemente que se representan en la Lista V, más preferentemente que se representan en la Lista VI.

Un objeto adicional también es un kit que comprende un conjunto de oligonucleótidos para amplificar al menos un polinucleótido asociado a enteritis necrótica, en donde el al menos un polinucleótido se selecciona de los polinucleótidos que se representan en la Lista IV, preferentemente que se representan en la Lista V, más preferentemente que se representan en la Lista VI.

Ya se ha tratado que NetB y TpeL son toxinas importantes que participan en la patogénesis de la enteritis necrótica (Keyburn et al, 2010; documento de patente WO 2008/148166; Shojadoost et al., 2012). ColA representa colagenasa A de *Clostridium perfringens*; este gen se podría asociar a la patogénesis de EN debido a su similitud con la denominada kappa-toxina, una de las supuestas principales toxinas de esta bacteria (Obana et al., 2013).

Sin embargo, no era de esperar la aparición, así como la desregulación, de estos genes en microvesículas.

Se conoce que el gen virX regula los genes plx, colA y pfoA en *C. perfringens* (Ohtani et al., 2002), pero no se ha informado antes de su participación en la patogénesis de EN.

Tampoco se informó previamente que el ARN citoplásmico pequeño (ARNcp), un miembro de una familia de ARN de tipo partícula de reconocimiento de señales evolutivamente conservada, participó en el mecanismo de esporulación de *Clostridium perfringens* (Nakamura et al., 1995) estuviera en asociación directa con EN en pollos.

Además, no se ha desvelado antes la participación del dominio SAM, el dominio de dedos de cinc swim y la región CPE0956, en la patogénesis de la enteritis necrótica y tampoco se hubiera esperado ya que estas secuencias son secuencias con funciones previamente desconocidas. Un objeto adicional son, por lo tanto, los polinucleótidos, preferentemente que codifican un polipéptido con actividad de toxina y/o un factor de virulencia que participa en la enteritis necrótica, seleccionados del grupo que consiste en

a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 100, preferentemente al menos 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1;

- b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1;
- 5 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 100, preferentemente al menos 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 3;
- 10 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 3;
- 15 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 100, preferentemente al menos 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 7;
- 20 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 7;
- g) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (f);
- h) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (g).

Se prefieren particularmente polinucleótidos seleccionados del grupo que consiste en

- 25 a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 100, preferentemente al menos 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferentemente 460 a 560, de SEQ ID NO: 1;
- 30 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferentemente 460 a 560, de SEQ ID NO: 1;
- 35 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 100, preferentemente al menos 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 600 a 1000, en particular 670 a 760, de SEQ ID NO: 3;
- 40 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 600 a 1000, en particular 670 a 760, de SEQ ID NO: 3;
- 45 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 100, preferentemente al menos 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 591, en particular 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;
- f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90 %, preferentemente al menos 95, 98 o 99 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 1 a 591, en particular 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;
- g) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (f);
- h) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (g).
- 50 Un objeto adicional también son, por lo tanto, polipéptidos, que son preferentemente toxinas y/o factores de virulencia que participan en la enteritis necrótica, seleccionados del grupo que consiste en

a) polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polipéptido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, en particular todos los aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 2;

5 b) polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polipéptido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60 o 70, en particular todos los aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 14;

10 c) polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polipéptido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 190, en particular todos los aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 15;

d) polipéptidos que comprenden los polipéptidos según (a) a (c).

Particularmente se prefieren polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en

15 a) polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polipéptido que comprende al menos 100, preferentemente al menos 150, 180 o 200, en particular todos los aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 2;

20 b) polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polipéptido que comprende al menos 40, preferentemente al menos 60 o 70, en particular todos los aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 14;

25 c) polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polipéptido que comprende al menos 100, preferentemente al menos 150, 180 o 190, en particular todos los aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 15;

d) polipéptidos que comprenden los polipéptidos según (a) a (c).

30 Un objeto adicional también es, por lo tanto, un método de fomentar una respuesta inmunitaria en un animal; comprendiendo el método administrar al animal un polipéptido como se mencionó antes, en particular seleccionado del grupo que consiste en

a) polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polipéptido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, en particular todos los aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 2;

35 b) polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polipéptido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60 o 70, en particular todos los aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 14;

40 c) polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polipéptido que comprende al menos 10, preferentemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 190, en particular todos los aminoácidos consecutivos de la secuencia de aminoácidos como se representa en SEQ ID NO: 15;

d) polipéptidos que comprenden los polipéptidos según (a) a (c).

45 Los polipéptidos presentan preferentemente actividad de toxina y preferentemente son obtenibles de *Clostridium perfringens*. Más preferentemente, los polipéptidos según la invención son factores de virulencia asociados a NE.

Un objeto adicional son vectores, en particular vectores de clonación y de expresión, así como vectores virales y plasmídicos, que comprenden un polinucleótido según la invención.

Un objeto adicional también son células, en particular células bacterianas, preferentemente células de *E. coli*, que comprenden un polinucleótido, un polipéptido y/o un vector según la invención.

50 Un objeto adicional es un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento del mismo, que se une específicamente a un polipéptido con actividad de toxina según la invención, en particular a factores de virulencia asociados a NE como se desvela en el presente documento.

Un objeto adicional es una composición que comprende un polinucleótido, un polipéptido, un vector, una célula o un anticuerpo como se desvela en el presente documento.

Un objeto adicional es un kit de diagnóstico que comprende un polinucleótido o un anticuerpo como se desvela en el presente documento. El kit puede comprender además un aparato con superficie de captura adecuado para separar microvesículas de una muestra biológica de partículas, residuos y moléculas pequeñas no deseadas, como se explica más abajo en más detalle. El kit también podría incluir instrucciones para su uso, en particular para el uso de los componentes en el aislamiento y la lisis opcional de microvesículas y la posterior determinación cualitativa o cuantitativa de la presencia de al menos uno de los marcadores que se desvela en el presente documento.

Un objeto adicional es una composición inmunogénica que comprende un polipéptido como se desvela en el presente documento y un adyuvante y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un objeto adicional también es una vacuna, que comprende un polipéptido como se desvela en el presente documento y preferentemente un adyuvante y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las microvesículas que se desvelan en el presente documento comprenden vesículas de la membrana de bacterias, en particular de *Clostridium perfringens*, así como del hospedador, en particular pollo. La versión eucariota de vesículas de membrana también se denomina exosomas. Los exosomas tienen normalmente un diámetro de 30-200 nm. Se derraman en todos los líquidos biológicos y llevan muchas proteínas y oligonucleótidos intactos, ya que se protegen de la degradación por RNasas (Koga et al., 2011). Los exosomas se han estudiado en particular en cáncer y células inmunitarias.

Las microvesículas de bacterias también se denominan vesículas de la membrana extracelular (VM) o vesículas de la membrana externa (VME). Son estructuras bicapa esféricas con diámetro promedio de normalmente 20-500 nm. Las microvesículas bacterianas se describieron por primera vez para bacterias Gram-negativas, pero después también para algunas bacterias Gram-positivas. En un estudio reciente, se informó que las microvesículas también se producían y liberaban por cepas de tipo A de *C. perfringens*, desencadenando respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Se encontró además en el transcurso de este estudio que los factores de virulencia importantes como la alfa-toxina y NetB no estaban presentes en las vesículas de membrana, aunque se encontró la beta2-toxina en las vesículas de membrana (Jiang et al., (2014)).

Los microARN (miARN) son ARN pequeños no codificantes que tienen normalmente 18-23 nucleótidos de tamaño y se ha sugerido que desempeñan una función crítica en la regulación de la expresión génica. En particular, se ha informado que los genes asociados a las respuestas inmunitarias son altamente silenciados por miARN. En pollos, se ha estudiado la expresión de miARN en procesos de desarrollo del embrión, desarrollo de células germinativas, órganos inmunitarios y enfermedades.

En estudios recientes, se investigó el perfil de miARN de dos líneas de pollo White Leghorn diferentes altamente endogámicas infectadas por *C. perfringens* (Dinh et al., 2014; Hong et al., 2014). Se llevó a cabo análisis de ARN con tejido de bazo y mucosa intestinal. Los resultados sugieren que algunos miARN están diferencialmente alterados en la respuesta a la enteritis necrótica y que modulan la expresión de sus genes diana. Las microvesículas no se investigaron en estos estudios.

Los miARN que se ha encontrado que se correlacionan con la enteritis necrótica como se desvela en el presente documento se investigaron antes por Wang et al. a propósito de pollos de engorde infectados por el virus de la gripe aviar (Wang et al., 2012). Wang et al. encontraron que los miARN miR-155, miR-16-1 y miR-24 se expresan más fuertemente en los pulmones de pollos de engorde infectados que en los de los no infectados, pero encontraron además que miR-206, al contrario, se expresa más fuertemente en los no infectados que en los infectados. Así, el uso de miR-206 como marcador para una infección bacteriana se desvela en la presente solicitud por primera vez. Además, a diferencia de Wang et al. como se desvela en el presente documento, todos los miARN se detectaron en microvesículas, no en tejido.

Así, un objeto adicional de la presente divulgación es un método de detección de una infección bacteriana aviar, en particular enteritis necrótica aviar, comprendiendo el método aislar microvesículas de una muestra aviar y posteriormente determinar el nivel de al menos un marcador aviar indicativo de la infección, en donde un aumento del nivel de este al menos un marcador aviar en comparación con un control no infectado es indicativo de la infección y en donde el al menos un marcador aviar es un miARN aviar y se selecciona preferentemente del grupo que consiste en

a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40, 60 o 80, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 10;

b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente

al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 11;

c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 12;

d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 13;

e) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (d);

f) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (e);

g) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (f).

En este método, las secuencias se seleccionan preferentemente del siguiente grupo:

a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 14 a 25 de SEQ ID NO: 10;

b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 44 a 65 de SEQ ID NO: 11;

c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 3 a 24 de SEQ ID NO: 12;

d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 45 a 66 de SEQ ID NO: 13,

e) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (d);

f) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (e);

g) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (f).

Como mir-206 se pudo identificar por primera vez como marcador para infecciones aviarias, en todos los casos, un objeto adicional es un método de detección de una infección aviar, preferentemente una infección bacteriana aviar, más preferentemente enteritis necrótica aviar, en donde un aumento del nivel de al menos un marcador aviar en comparación con un control no infectado es indicativo de la infección y en donde el al menos un marcador aviar se selecciona del grupo que consiste en

a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 13;

b) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a);

c) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) o (b).

En este método, las secuencias se seleccionan preferentemente del siguiente grupo:

a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferentemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos según la posición 45 a 66 de SEQ ID NO: 13,

b) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a);

c) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) o (b).

Las aplicaciones de los métodos desvelados en el presente documento son, por ejemplo, (i) ayudar en el diagnóstico y/o el pronóstico de enteritis necrótica aviar, (ii) monitorizar el progreso o la remanifestación de enteritis necrótica aviar, o (iii) ayudar en la evaluación de la eficacia del tratamiento para un sujeto aviar que recibe o que contempla un tratamiento para enteritis necrótica; en donde se determina la presencia o ausencia de uno o más de los biomarcadores mencionados antes en la extracción de ácidos nucleicos obtenida del método, y el uno o más biomarcadores se asocian con el diagnóstico, progreso o remanifestación, o eficacia del tratamiento, respectivamente, de la enteritis necrótica.

Las aplicaciones de la invención ayudan en particular a evitar la pérdida en el rendimiento aviar, como el aumento de peso y la conversión de pienso.

Aislamiento de microvesículas

El aislamiento de microvesículas de una muestra biológica antes de la extracción de ácidos nucleicos es ventajosa, debido a que las microvesículas que contienen ácido nucleico producen rendimientos significativamente mayores de especies de ácido nucleico con mayor integridad en comparación con el rendimiento/la integridad obtenido extrayendo ácidos nucleicos directamente de la muestra de líquido o excremento sin aislar primero las microvesículas. Además, también es posible detectar ácidos nucleicos que se expresan a bajos niveles. El aislamiento de microvesículas también permite la exclusión de proteínas, lípidos, residuo celular, células y otros posibles contaminantes e inhibidores de PCR que se encuentran naturalmente dentro de muestras biológicas.

El aislamiento de vesículas de membrana de las muestras biológicas y la posterior extracción de los ácidos nucleicos se puede hacer, por ejemplo, por ultracentrifugación, por ejemplo, centrifugando a más de 10.000 g durante 1-3 horas, seguido por retirada del sobrenadante, lavado del sedimento, lisado del sedimento y purificación de los ácidos nucleicos sobre una columna. Los métodos alternativos son ultrafiltración, por ejemplo, usando filtros de 100 kD, técnicas de precipitación de polímeros y/o filtración basada en el tamaño.

Los métodos alternativos adicionales son la centrifugación diferencial como se describe por Raposo et al. (1996), Skog et al. (2008) y Nilsson et al. (2009); intercambio iónico y/o cromatografía de exclusión molecular como se describe en las patentes de EE. UU. N° 6.899.863 y 6.812.023; gradientes de densidad de sacarosa o electroforesis de orgánulos como se describe en la patente de EE. UU. N° 7.198.923; clasificación celular activada magnéticamente (MACS) como se describe por Taylor y Gercel-Taylor (2008); concentración por ultrafiltración en nanomembrana como se describe por Cheruvanku et al. (2007); aislamiento en gradiente de Percoll como se describe por Miranda et al. (2010); y, aislamiento por un dispositivo microfluídico, Chen et al. (2010).

Aislamiento de microvesículas basado en la superficie de captura según el documento de patente WO 2014/107571.

En una realización preferida, la fracción de microvesículas se une a una superficie de captura, en particular a una membrana, un filtro o a una perla modificada en la superficie como se desvela en el documento de patente WO 2014/107571.

La muestra biológica se disuelve preferentemente en un tampón de carga, que tiene preferentemente un pH de 4-8, más preferentemente 5-7. Así, la unión a la superficie de captura tiene lugar preferentemente a un pH de 4-8, más preferentemente 5-7. Preferentemente, después de poner en contacto la muestra biológica con la superficie de captura, se realizan una o más etapas de lavado.

Los tampones de carga y de lavado que se pueden emplear como se desvela en el presente documento pueden ser de alta o baja fuerza iónica. Así, la concentración de sales, por ejemplo, la concentración de NaCl, puede ser desde 0 hasta 2,4 M. Preferentemente, los tampones incluyen uno o más de los siguientes componentes: Tris, Bis-Tris, Bis-Tris-propano, imidazol, citrato, ácido metilmalónico, ácido acético, etanolamina, dietanolamina, trietanolamina (TEA) y fosfato de sodio.

El lavado tiene lugar preferentemente usando tampón de lavado que comprende Bis-Tris-propano 250 mM y que presenta un pH de 6,5-7,0.

Añadiendo detergentes al tampón de lavado se suprime la unión no específica. Los detergentes adecuados para su uso incluyen, pero no se limitan a, dodecilsulfato de sodio (SDS), Tween-20, Tween-80, Triton X-100, Nonidet P-40 (NP-40), Brij-35, Brij-58, octilglucósido, octiltioglucoído, CHAPS o CHAPSO.

Después de lavar la superficie de captura, se puede liberar el ácido nucleico lisando las microvesículas fijadas. Para lisar las microvesículas fijadas se usa preferentemente un tampón de lisis basado en fenol, como el reactivo de lisis QIAzol® (Qiagen, Alemania). La purificación del ácido nucleico se puede hacer entonces por extracción con cloroformo usando tubos de PLG, seguido por acondicionamiento con etanol. Entonces se puede unir el ácido nucleico a una columna de sílice antes del lavado y la elución.

También se puede lograr la lisis de microvesículas y la extracción de ácidos nucleicos usando un kit Qiagen R easy Plus comercialmente disponible, un kit Qiagen miR easy comercialmente disponible o usando fenol-cloroformo según procedimientos convencionales y técnicas conocidas en la técnica. Dichos métodos también pueden utilizar una columna de unión a ácido nucleico para capturar los ácidos nucleicos contenidos dentro de las microvesículas. Una vez unidos, los ácidos nucleicos se pueden eluir entonces usando un tampón o disolución adecuado para romper la interacción entre los ácidos nucleicos y la columna de unión.

Los métodos de extracción de ácido nucleico también pueden incluir el uso de agentes adicionales como un inhibidor de la RNasa, tal como Superase-In (comercialmente disponible de Ambion Inc.) o RNaseINplus (comercialmente disponible de Promega Corp.); una proteasa (que también puede servir de un inhibidor de RNasa); DNasa; un agente reductor; un sustrato señuelo tal como un ARN sintético y/o ARN portador; un receptor soluble que se puede unir a RNasa; un ARN interferente pequeño (ARNip); una molécula de unión a ARN, tal como un anticuerpo anti-ARN, una proteína básica o una proteína chaperona; una sustancia desnaturalizante de RNasa, tal como una disolución de alta osmolaridad, un detergente, o una combinación de los mismos. Los inhibidores de RNasa, así como los agentes adicionales, se pueden añadir a la muestra biológica, y/o a la fracción de microvesículas aisladas, antes de extraer los ácidos nucleicos.

Estos agentes adicionales pueden ejercer sus funciones de diversas formas, por ejemplo, mediante la inhibición de la actividad de RNasa (por ejemplo, inhibidores de RNasa), mediante una degradación ubicua de proteínas (por ejemplo, proteasas), o mediante una proteína chaperona (por ejemplo, una proteína de unión a ARN) que se une y protege ARN. En todos los casos, dicho agente de mejora de la extracción retira o al menos mitiga alguno o todos los factores adversos en la muestra biológica o asociados a las partículas aisladas que prevendrían o interferirían de otro modo con la extracción de alta calidad de los ácidos nucleicos de las partículas aisladas.

Se puede usar la cuantificación de ARNr 18S y 28S extraídos para determinar la calidad de la extracción del ácido nucleico.

La superficie de captura puede ser neutra, negativamente cargada o positivamente cargada. Esto significa que, en principio, se puede usar cualquier tipo de superficie de captura. Dependiendo del material de membrana, los tamaños de poro de la membrana pueden variar de 20 nm a 5 µm.

En particular, la superficie de captura puede ser una membrana comercialmente disponible como la membrana de intercambio iónico Mustang® de PALL Corporation; Vivapure® Q, Vivapure® Q Maxi H; Sartobind® D, Sartobind® (S), Sartobind® Q, Sartobind® IDA o Sartobind® Aldehyde de Sartorius AG; Whatman® DE81 de Sigma; columna de purificación de virus Fast Trap de EMD Millipore; o columnas de centrifugación de intercambio catiónico y aniónico fuerte de Thermo Scientific* Pierce.

Cuando se usa una membrana para fijar los ácidos nucleicos, entonces la membrana se puede preparar de una variedad de materiales adecuados, por ejemplo, puede ser una poliétersulfona (PES) (por ejemplo, de Millipore o PALL Corp.) o celulosa regenerada (RC) (por ejemplo, de Sartorius o Pierce).

Cuando se usa una membrana negativamente cargada, entonces la superficie de captura es preferentemente una membrana S, que es una membrana negativamente cargada y es un intercambiador catiónico con grupos ácido sulfónico. Preferentemente, la membrana S se funcionaliza con ácido sulfónico, $R-CH_2-SO_3^-$. Alternativamente, la superficie de captura negativamente cargada es una membrana D, que es un intercambiador aniónico básico débil con grupos dietilamina, $R-CH_2-NFT(C_2H_5)_2$. Alternativamente, la superficie de captura es una membrana de quelato metálico. Por ejemplo, la membrana es una membrana IDA, funcionalizada con ácido minodiacético $-N(CH_2COOH)_2$. En algunas realizaciones, la superficie de captura es una membrana microporosa, funcionalizada con grupos aldehído, $-CHO$. En otras realizaciones, la membrana es un intercambiador aniónico básico débil, con dietilaminoetil (DEAE)-celulosa.

Cuando se usa una superficie de captura neutra, entonces la superficie de captura es preferentemente un filtro seleccionado del grupo que consiste en una filtración en jeringa de PES neutro de 20 nm (Tisch y Exomir), filtración en jeringa de PES neutro de 30 nm (Sterlitech), filtración en jeringa de PES neutro de 50 nm (Sterlitech), filtración en columna de centrifugación fabricada internamente de PES neutro de 0,2 µm (Pall), filtración en columna de centrifugación fabricada internamente de PES neutro de 0,8 µm (Pall) y filtración en jeringa de PES neutro de 0,8 µm (Pall). En realizaciones donde la superficie de captura es neutra, la superficie de captura neutra no se aloja preferentemente en un filtro de jeringa.

La superficie cargada se selecciona preferentemente del grupo que consiste en filtración a vacío Q PES positivamente cargada de 0,65 µm, filtración en columna de centrifugación Q RC positivamente cargada de 3-5 µm, filtración en columna de centrifugación fabricada internamente Q PES positivamente cargada de 0,8 µm, filtración en jeringa Q PES positivamente cargada de 0,8 µm, filtración en columna de centrifugación casera S PES negativamente cargada de 0,8 µm, filtración en jeringa S PES negativamente cargada de 0,8 µm y filtración en jeringa de nailon negativamente cargada de 50 nm.

En la realización preferida, cuando la superficie es una membrana positivamente cargada, se puede usar una membrana Q, que es una membrana positivamente cargada y es un intercambiador aniónico con aminas cuaternarias. En una realización preferida, la membrana Q está funcionalizada con amonio cuaternario, $R-CH_2-N^+(CH_3)_3$.

- 5 En una realización muy preferida, la membrana positivamente cargada es una celulosa regenerada, membrana intercambiadora aniónica básica fuerte ("RC/SBAE"), que es un intercambiador aniónico con aminas cuaternarias. En una realización preferida, la membrana RC/SBAE está funcionalizada con amonio cuaternario, $R-CH_2-N^+(CH_3)_3$. El tamaño de poro de la membrana es preferentemente al menos 3 μm .

- 10 La superficie de captura, por ejemplo, membrana, puede estar alojada dentro de un dispositivo usado para la centrifugación; por ejemplo, columnas de centrifugación, o para aplicación de vacío, por ejemplo, portafiltras de vacío, o para la filtración con presión, por ejemplo, filtros de jeringa.

- 15 En un proceso de purificación basado en columna de centrifugación se usa preferentemente más de 1 membrana, preferentemente 2 a 5 membranas, en paralelo en un tubo, en donde las membranas son todas preferentemente directamente adyacentes entre sí en un extremo de la columna. El tubo de recogida puede estar comercialmente disponible, como un tubo Falcon de 50 mL. La columna es preferentemente adecuada para centrifugación, es decir, el tamaño es compatible con las máquinas centrifugadoras y microcentrifugadoras habituales.

En lugar de una membrana también se puede usar una perla con la misma modificación superficial para capturar el ácido nucleico. Si se usa una perla, puede ser magnética o no magnética.

- 20 Si se usa sangre como muestra, la sangre se puede recoger, por ejemplo, en tubos de EDTA K2 y mezclar bien con inversiones completas. Entonces se centrifugan los tubos a 1300 x g durante 10 min para separar los glóbulos sanguíneos y el plasma. Entonces se retira el plasma y se filtra a través de un filtro de 0,8 μm para retirar el residuo celular y las plaquetas. Entonces se toman todas las muestras de plasma en alícuotas en crioviales de 1 mL y se conservan a -80 °C hasta su uso.

- 25 Antes del aislamiento de ARN, la membrana se acondiciona preferentemente pasando a través de tampón de equilibrio. La muestra de plasma descongelada se diluye con tampón de carga. La muestra de plasma diluida se pasa lentamente a través de la membrana que adsorbe las microvesículas. Entonces se lava la membrana con un tampón de lavado para retirar cualquier componente del plasma débilmente unido. Entonces se pasa un reactivo de lisis a través de la membrana para lisar las microvesículas. Se aísla ARN usando el kit miRNeasy kit (Qiagen).

- 30 Se pueden evaluar el ARN para la calidad y concentración con el bioanalizador 2100 (Agilent) usando un RNA 6000 Pico Chip. Se mide la cantidad relativa de ARN extraído por RT-qPCR usando ensayos de expresión génica humana seleccionada de Applied Biosystems (ensayo Taqman).

- 35 En realizaciones preferidas, en particular cuando se usan muestras fecales o cecales solubilizadas, se realiza una etapa previa al procesamiento antes del aislamiento, la purificación o el enriquecimiento de las microvesículas para retirar partículas grandes no deseadas, células y/o residuo celular y otros contaminantes presentes en la muestra biológica. Las etapas de procesamiento previo se pueden lograr mediante una o más etapas de centrifugación (por ejemplo, centrifugación diferencial) o una o más etapas de filtración (por ejemplo, ultrafiltración), o una combinación de las mismas. Donde se realiza más de una etapa de centrifugación previa al procesamiento, la muestra biológica se puede centrifugar primero a una velocidad más baja y luego a una velocidad más alta. Si se desea, se pueden llevar a cabo etapas de centrifugación previas al procesamiento adecuadas adicionales. Alternativamente o además de la una o más etapas de centrifugación previas al procesamiento, la muestra biológica se puede filtrar. Por ejemplo, 40 primero se puede centrifugar una muestra biológica a una velocidad baja de aproximadamente 100-500 g, preferentemente 250-300 g, y después de eso a una velocidad más alta de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 200.000 g, preferentemente a aproximadamente 20.000 g, durante 10 minutos a aproximadamente 1 hora, preferentemente a una temperatura de 0-10 °C, para retirar partículas grandes no deseadas; entonces se puede filtrar la muestra, por ejemplo, usando un filtro con un tamaño de exclusión de 0,1 a 1,0 μm .

- 45 Las microvesículas en el sedimento obtenido por centrifugación a mayores velocidades se pueden reconstituir con un volumen más pequeño de un tampón adecuado para las etapas posteriores del proceso. La etapa de concentración también se puede realizar por ultrafiltración. En realidad, esta ultrafiltración tanto concentra la muestra biológica como realiza una purificación adicional de la fracción de microvesículas. En otra realización, la filtración es una ultrafiltración, preferentemente una ultrafiltración tangencial. La ultrafiltración tangencial consiste en concentrar y fraccionar una disolución entre dos compartimentos (filtrado y concentrado), separados por membranas de determinados umbrales de corte. La separación se lleva a cabo aplicando un flujo en el compartimento concentrado y una presión transmembrana entre este compartimento y el compartimento de filtrado. Se pueden usar diferentes sistemas para 50 realizar la ultrafiltración, tales como membranas en espiral (Millipore, Amicon), membranas planas o fibras huecas (Amicon, Millipore, Sartorius, Pall, GF, Sepracor). Es ventajoso el uso de membranas con un umbral de corte inferior a 1000 kDa, preferentemente entre 100 kDa y 1000 kDa, o incluso más preferentemente entre 100 kDa y 600 kDa.

Como etapas de procesamiento adicionales o alternativas se podría llevar a cabo cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de afinidad antes o después de poner en contacto la muestra biológica con la superficie de captura.

Para realizar la etapa de cromatografía de exclusión molecular, se usa preferentemente un soporte seleccionado de sílice, acrilamida, agarosa, dextrano, copolímero de etilenglicol-metacrilato o mezclas de los mismos, por ejemplo, mezclas de agarosa-dextrano. Por ejemplo, dichos soportes incluyen, pero no se limitan a: SUPERDEX® 200HR (Pharmacia), TSK G6000 (TosoHaas) o SEPHACRYL® S (Pharmacia).

- 5 La cromatografía de afinidad se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando diferentes soportes, resinas, perlas, anticuerpos, aptámeros, análogos de aptámeros, polímeros molecularmente impresos, u otras moléculas conocidas en la técnica que se dirigen específicamente a las moléculas de superficie deseadas sobre las microvesículas.

- 10 Opcionalmente, se pueden añadir partículas de control a la muestra antes del aislamiento de las microvesículas o la extracción de ácidos nucleicos para servir de control interno para evaluar la eficiencia o calidad de la purificación de microvesículas y/o la extracción de ácidos nucleicos. Estas partículas de control incluyen bacteriófago Q-beta, partículas de virus, o cualquier otra partícula que contenga ácidos nucleicos de control (por ejemplo, al menos un gen diana de control) que pueda existir de forma natural o esté manipulada por técnicas de ADN recombinante. El gen diana de control se puede cuantificar usando análisis de PCR tiempo real.

- 15 Preferentemente, la partícula de control es un bacteriófago Q-beta, denominado en el presente documento "partícula Q-beta". La partícula Q-beta puede ser una partícula de virus que existe de forma natural o puede ser un virus recombinante o manipulado, en el que al menos un componente de la partícula de virus (por ejemplo, una porción del genoma o proteína de la envoltura) se sintetiza por ADN recombinante o técnicas de biología molecular conocidas en la técnica. Q-beta es un miembro de la familia leviviridae, caracterizado por un genoma de ARN monocatenario lineal que consiste en 3 genes que codifican cuatro proteínas virales: una proteína de la envoltura, una proteína de
20 maduración, una proteína de lisis y ARN replicasa. Debido a su tamaño similar con respecto a las microvesículas promedio, Q-beta se puede purificar fácilmente de una muestra biológica usando los mismos métodos de purificación usados para aislar microvesículas, como se describe en el presente documento. Además, es ventajosa la baja complejidad de la estructura del gen monocatenario viral Q-beta para su uso como control en ensayos de ácidos nucleicos basados en amplificación. La partícula Q-beta contiene un gen diana de control o secuencia diana de control
25 que se va a detectar o medir para la cuantificación de la cantidad de partícula Q-beta en una muestra. Por ejemplo, el gen diana de control es el gen de la proteína de la envoltura Q-beta. Después de la adición de las partículas Q-beta a la muestra biológica, los ácidos nucleicos de la partícula Q-beta se extraen junto con los ácidos nucleicos de la muestra biológica usando los métodos y/o kits de extracción descritos en el presente documento. La detección del gen diana de control Q-beta se puede determinar por análisis por RT-PCR, por ejemplo, simultáneamente con los biomarcadores de interés (es decir, BRAF). Se puede usar una curva patrón de al menos 2, 3 o 4 concentraciones conocidas en dilución al 10 % de un gen diana de control para determinar el número de copias. Se puede comparar el número de copias detectado y la cantidad de partícula Q-beta añadida para determinar la calidad del proceso de aislamiento y/o de extracción.

- 35 Así, se añadieron 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 1.000 o 5.000 copias de partículas Q-beta a una muestra de líquido corporal. En una realización preferida, se añaden 100 copias de partículas Q-beta a una muestra de líquido corporal. Se puede calcular el número de copias de partículas Q-beta basándose en la capacidad del bacteriófago Q-beta de infectar células diana. Así, el número de copias de partículas Q-beta se correlaciona con las unidades formadoras de colonias del bacteriófago Q-beta.

Detección de biomarcadores de ácido nucleico

- 40 Para la detección de ARN, el ARN se retrotranscribe preferentemente en ADN complementario (ADNc) antes de la amplificación adicional. Dicha retrotranscripción se puede realizar sola o en combinación con una etapa de amplificación. Un ejemplo de un método que combina etapas de retrotranscripción y de amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción (RT-PCT), que se puede modificar aún más para ser cuantitativa, por ejemplo RT-PCT cuantitativa como se describe en la patente de EE. UU. Nº 5.639.606. Otro ejemplo del método
45 comprende dos etapas separadas: una primera de retrotranscripción para convertir ARN en ADNc y una segunda etapa de cuantificación de la cantidad de ADNc usando PCR cuantitativa.

- El análisis por RT-PCR determina un valor Ct (ciclo umbral) para cada reacción. En RT-PCR, se detecta una reacción positiva por la acumulación de una señal de fluorescencia. El valor de Ct se define como el número de ciclos requeridos para la señal fluorescente para cruzar el umbral (es decir, supera el nivel de fondo). Los niveles de Ct son inversamente
50 proporcionales a la cantidad de ácido nucleico diana, o ácido nucleico de control, en la muestra (es decir, cuanto más bajo es el nivel de Ct, mayor es la cantidad de ácido nucleico de control en la muestra). Alternativamente, el número de copias del ácido nucleico de control se puede medir usando otras técnicas reconocidas en la técnica.

- El análisis de ácidos nucleicos presente en las partículas aisladas es cuantitativo y/o cualitativo. Para el análisis cuantitativo, las cantidades (niveles de expresión), ya sea relativas o absolutas, de ácidos nucleicos específicos de
55 interés dentro de las partículas aisladas se miden con métodos conocidos en la técnica. Para el análisis cualitativo, las especies de ácidos nucleicos específicos de interés dentro de las microvesículas aisladas se identifican con métodos conocidos en la técnica.

Ejemplos de trabajo

Preparación de la inoculación

Se sacó del almacenamiento a -80 °C cepa aislada de *Clostridium perfringens* que era positiva para netB y tpeL y se sembró en estrías asépticamente sobre placas de agar con tripton y soja que contenía 5 % de sangre de oveja (TSA II). Las placas se incubaron a 37 °C durante la noche en condiciones anaerobias. Quince horas antes del comienzo del cultivo del inóculo, se inoculó una colonia aislada de la placa durante la noche en 50 mL de caldo BHI previamente reducido y se incubó a 37 °C en condiciones anaerobias durante aproximadamente 15 horas. Entonces se añadieron 50 µL del cultivo a 2 x 100 mL de BHI previamente reducido. Se escalonaron los cultivos de caldo resultantes de manera que la alta dosis y la baja dosis alcanzaran sus concentraciones finales al mismo tiempo (10⁹ UFC/mL y 10⁶ UFC/mL, respectivamente). Se tomaron alícuotas de cada cultivo al final del periodo de crecimiento y se sembraron sucesivamente sobre agar TSA II + 5 % de sangre de oveja para verificar la concentración bacteriana.

Experimento animal

Se criaron setecientos veinte (720) pollos de engorde macho en 36 jaulas en batería durante 30 días. Las aves se asignaron igualmente y aleatoriamente (9 jaulas a cada uno) a uno de los cuatro grupos de tratamiento (control negativo, simulación, sonda nasogástrica de baja dosis y sonda nasogástrica de alta dosis). Las aves se alimentaron con pienso común de maíz/soja sin antimicrobianos. En el día 13 de cría, se sacaron las aves con sobrepeso o con bajo peso de todas las jaulas y se excluyeron del experimento. Entonces, el ave con intervalo de peso normal se expuso por vía oral sucesivamente en los días 14, 15 y 16 a 1 mL de cepa de *C. perfringens* que alojaba el plásmido netB y que era positiva para el gen TpeL. El grupo de simulación se expuso a 1 mL de PBS, mientras que el grupo de control negativo no se sometió a ningún estrés o exposición a patógenos. Antes de la primera inoculación (día 14), se seleccionaron aleatoriamente 3 aves de cada jaula, se sacrificaron para la recogida de sangre y muestras de digesto. Doce horas después de la segunda exposición, en el día 15, se sacrificaron nuevamente 3 aves de cada jaula para el muestreo de sangre y digestos. Se cultivó durante la noche el contenido del intestino de todas las aves sacrificadas para determinar la relación entre *C. perfringens* esporulado y las células vegetativas, como se describe previamente (Heikinheimo et al., 2004). Para evaluar si la exposición fue satisfactoria, se realizó la PCR de los genes *NetB* y *TpeL* del contenido del intestino. Se dejaron al menos 10 aves en cada una de las jaulas hasta el final del ensayo. Se recogieron muestras de excrementos en intervalos hasta que se terminó el estudio en el día 20 cuando se sacrificaron todas las aves y se obtuvieron tres muestras de mezclas de sangre de cada grupo. Se examinaron los GIT de las aves para signos/lesiones típicos de EN y se tomaron necropsias del tubo gastrodigestivo del duodeno y el yeyuno para el análisis histopatológico. Se determinaron los indicadores del rendimiento de pollos de engorde como la tasa de mortalidad, el consumo de pienso y la patología de grupo (Tabla 3).

Recogida de muestras

1. Recogidas de muestras de excrementos fecales y cecales

Se colocaron hojas de papel en las jaulas para recoger muestras reunidas fecales y reunidas cecales cada 2 horas después de la primera exposición hasta 12 horas después de la segunda inoculación (día 15). Posteriormente, las muestras se recogieron cada 4 horas hasta el día 17. Al final del ensayo en el día 20, también se recogieron muestras fecales y cecales. Durante cualquiera de los acontecimientos de recogida, se obtuvo al menos 1 gramo de fecal y cecal por jaula, y las muestras se conservaron a -80 °C.

2. Extracción de sangre

Se recogió sangre directamente del corazón usando una aguja de calibre 18. Se recogieron aproximadamente 5-6 mL de sangre completa de 3 aves seleccionadas al azar por jaula y se transfirieron a tubos de recogida que contenían EDTA. Se retiraron las células del plasma por centrifugación durante 10 minutos a 1.000-2.000 x g usando una centrifugadora refrigerada. Después de la centrifugación, el componente líquido (plasma) se transfirió inmediatamente a un tubo de polipropileno limpio y se conservó a -20 °C.

3. Recogida del contenido del intestino

Se recogió el contenido del intestino de un intestino de aproximadamente 20 cm de longitud. Se expulsó el contenido del intestino y se cortó en PBS + 20 % de glicerol e inmediatamente se congeló a -20 °C. Entonces se usaron muestras para la cuantificación de *C. perfringens* vegetativo frente a esporulado y detección por PCR de netB y tpeL.

Histología del intestino del pollo

1. Recogida y procesamiento de tejido

Se retiró de cada ave una sección de 5 cm siguiendo el bucle duodenal y se puso en 10 % de formol, y el recipiente se agitó suavemente para sacar el pienso para permitir que el formol entrara en el intestino. Después de la fijación, los tejidos se lavaron bien en varios cambios de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se pusieron en etanol al 70 % para el almacenamiento. Para el procesamiento de tejidos y la infiltración de tejidos con parafina antes de hacer secciones de 5 µm, los tejidos se deshidrataron lavando 1x durante 2 min en disoluciones al 70 % y 95 % de etanol sucesivamente, y luego 2x durante 2 min en disolución al 100 % de etanol. Finalmente, los tejidos se aclararon 2x durante 1 minuto en xileno antes ser incorporados en parafina. Entonces se orientó el tejido procesado en un molde, se incorporó en un bloque de parafina y se cortó en un microtomo para generar secciones de 5 µm. Se flotan los cortes de tejido sobre portaobjetos modificados con poli-L-lisina (PLL). Los portaobjetos se secan y se disponen en un horno para "hornear" la parafina.

2. Tinción de secciones de tejido con hematoxilina y eosina de Harris

En resumen, se hidrataron las secciones disminuyendo sucesivamente la concentración de etanol: 2x durante 3 min cada vez en 100 % de etanol, 2x durante 3 min cada vez en 95 % de etanol y 1x durante 3 minutos en etanol al 70 %. Entonces se aclararon los portaobjetos durante 5 minutos en agua destilada y luego se tiñeron durante 6 minutos con disolución de hematoxilina (hematoxilina de Harris, Sigma, HHS-32). Los portaobjetos se aclararon en agua de grifo corriente durante aproximadamente 20 minutos y se decoloraron en alcohol ácido (etanol al 95 %, 2578 mL de dH₂O, 950 mL de HCL, 9 mL) durante 1-3 segundos. Se aclararon nuevamente los portaobjetos con agua de grifo corriente durante 5 minutos, luego se sumergieron en carbonato de litio durante 3 segundos y luego se aclararon con agua de grifo durante 5 minutos. Se contratiñeron los tejidos con disolución de trabajo de eosina (100 mL de eosina de reserva (1 % de eosina-Y acuosa y 1 % de floxina B acuosa), 10 mL de floxina B de reserva, 780 mL de etanol al 95 %, 4 mL de ácido acético glacial) durante 15 segundos y se rehidrataron por incubación sucesiva en disoluciones de etanol (2x durante 3 minutos cada vez en disolución al 95 % de etanol y 2x durante 3 minutos cada vez en disolución al 100 % de etanol). Finalmente, los tejidos se incubaron en disolución de xileno durante 5 minutos y luego se montaron con Cytoseal para el análisis.

Detección de genes *netB* y *tpeL* de *Clostridium perfringens* por PCR

Tabla 1. Pares de cebadores usados para la detección de genes *netB* y *tpeL* en cepas aisladas de *Clostridium perfringens* de intestino de pollo

ID de cebador	Secuencia	Gen diana	Longitud del producto
netB5F	CGCTTCACATAAAGGTTGGAAGGC	<i>netB</i>	316
netB5R	TCCAGCACCCAGCAGTTTTTCCT	<i>netB</i>	316
AKP80F	ATATAGAGTCAAGCAGTGGAG	<i>tpeL</i>	466
AKP81R	GGAATACCACTTGATATACCTG	<i>tpeL</i>	466

1. Extracción de ADN y cuantificación de la concentración de ADN

Se realizó la extracción de ADN de cepas aisladas de *C. perfringens* del contenido intestinal con kits de extracción de ADN comerciales de Qiagen, Hilden, Alemania, según las instrucciones del fabricante.

2. Amplificación de ADN

Se realizó la amplificación por PCR en un volumen final de 25 µL que contenía 1 ng de molde de ADN, 0,2 µM de cada uno de los cebadores para el gen a amplificar o detectar y 12 µL de 1x mezcla maestra de PCR que consistía en 1,2 unidades/25 µL de ADN polimerasa Taq. La amplificación se llevó a cabo en un sistema de PCR de amplificación génica, 9600 Thermocycler (Mastercycler de Eppendorf, Alemania). La desnaturalización inicial fue a 95 °C durante 5 min, seguido por 40 ciclos a 95 °C durante 30 s, hibridación a 55 °C durante 30 s y extensión a 72 °C durante 30 s, con una extensión final a 72 °C durante 7 minutos y mantenimiento a 40 °C.

Procesamiento de muestras

Se procesó un total de 36 muestras de plasma, 96 muestras fecales y 87 muestras cecales para el aislamiento y la extracción de ARN total de microvesículas. Los volúmenes de plasma de los diferentes animales variaron entre 0,5 mL y 3 mL.

Preparación de plasma

Brevemente, se recogió sangre en tubos K2 EDTA y se mezcló bien con inversiones completas. Entonces se centrifugaron los tubos a 1300 x g durante 10 min para separar los glóbulos sanguíneos y el plasma. Entonces se retiró el plasma y se filtró a través de un filtro de 0,8 µm para retirar el residuo celular y las plaquetas. Entonces se tomaron todas las muestras de plasma en alícuotas en crioviales de 1 mL y se conservaron -80 °C hasta su uso.

Aislamiento de microvesículas y extracción de ARN

Se han descrito previamente métodos del estado de la técnica de extracción de microvesículas y purificación adicional del contenido de microvesículas (MV) de biomateriales tales como sangre, LCR, tejidos y cultivos celulares en los documentos de patente US6899863B1 (Dhellen et al., 2005), EP 2 495 025 A1, WO 2014107571 A y 2014017885A1. Los métodos incluyen el uso de ultracentrifugación de alta velocidad, o el uso de centrifugación de baja velocidad para separar residuo celular, seguido por exclusión de tamaño o unión por afinidad a membranas específicas o filtración (véase la revisión por Witwer y colaboradores, 2013). También se han descrito varios métodos inmunológicos de purificación de microvesículas (Thery, et al., 2016; Clayton et al., 2001; Wubbolts et al., 2003). Las microvesículas se pueden purificar usando matrices, perlas o partículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos que se unen a proteínas de la superficie de microvesículas para seleccionar positivamente una población deseada o con anticuerpos que se unen a proteínas de la superficie de otros componentes celulares para su reducción (Kim et al., 2012 y Mathivanan et al., 2010). Los métodos rápidos de aislamiento de microvesículas disponibles para investigación incluyen el uso de dispositivos de microfluídica (2010, Chen, et al., 2010; documento de patente EP 2740536 A2) y kits comerciales (por ejemplo, SeraMir™ (System Biosciences), ExoSpin™ (Cell Guidance), ExoMir™ (Bio Scientific), miRCURY™ (Exiqon), que requieren poco o ningún equipo de laboratorio especializado.

En el presente documento, se realizó la extracción de microvesículas de muestras de plasma, fecales y cecales por los métodos descritos en el documento de patente WO2014/107571A1 (Enderle, et al., 2014). El método implicó el aislamiento de microvesículas de un líquido biológico capturándolas sobre la superficie de un filtro de membrana funcionalizada Q (Exo50, Exosome Diagnostics). Se liberó por lisis con Qiazol el contenido de ARN de las microvesículas capturadas, y entonces se purificó el ARN por extracción con cloroformo o con el kit comercial RNAeasy de Qiagen. En resumen, se dejó que la muestra de plasma se descongelara lentamente sobre hielo y se diluyó 1:1 con PBS o 0,9 % de NaOH; se centrifugó la disolución de plasma a 300 g durante 10 minutos para retirar las células y los residuos. El sobrenadante se pasó a través de un filtro de 0,8 µm y luego el flujo continuo se centrifugó a 20.000 g a 4 °C durante 30 minutos para retirar cualquier residuo celular restante. Se preconditionó la columna Exo50 con membrana de afinidad que se une a microvesículas dejando que pasaran a través de ella 5 mL de tampón de carga (2X) tampón fosfato 100 mM, NaCl 370 mM. Entonces, el sobrenadante que contenía las microvesículas obtenidas de la segunda etapa de centrifugación se enriqueció con 1000 copias de partícula Q-beta para examinar la eficiencia de extracción y de recuperación tras la carga sobre la columna de centrifugación previamente acondicionada. La columna se centrifugó brevemente y se desechó el flujo continuo. La columna se lavó dos veces con 2 mL de tampón de lavado (Bis-Tris-propano 250 mM, pH 6,5-7 y (1X) tampón fosfato 50 mM, NaCl 185 mM) y después del segundo lavado, la columna se centrifugó brevemente y se desechó el flujo continuo. Se lisaron las microvesículas unidas a la membrana para liberar el contenido mediante la adición de 5 mL (2,25 mL) de tampón de lisis (Qiazol) y se centrifugaron para recoger el lisado. Se extrajo ARN del lisado con el kit RNeasy, Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se reunió el ARN eluido con agua libre de RNasa para muestras duplicadas para obtener un volumen total de 46 µL por muestra. Se aplicó 1 µL de ARN en el kit Agilent RNA 6000 Nano para evaluar la calidad y la concentración del ARN, mientras que el ARN restante se almacenó a -80 °C para su uso adicional aguas abajo (Q-PCR o secuenciación). Se evaluó la eficiencia de extracción y la cantidad de extracción de ARN comparando la expresión del gen diana de control Q-beta (gen de la proteína de la envuelta Q-beta) en el ARN extraído por análisis por RT-PCR con la de los genes diana de interés. Se usó una curva patrón de al menos 2, 3 o 4 concentraciones conocidas en dilución al 10 % de un gen diana de control para determinar el número de copias. Se comparó el número de copias detectadas y la cantidad de partícula Q-beta añadida para determinar la calidad del proceso de aislamiento y/o de extracción.

Muestras fecales y cecales

Puesto que las muestras de plasma y cecales contienen materiales gruesos grandes, se aplican etapas de procesamiento previo adicionales antes de realizar el aislamiento de microvesículas y la extracción de ARN usando el kit Exo50 y métodos asociados como se ha descrito anteriormente para muestras de plasma. Por ejemplo, se dejó descongelar lentamente una muestra fecal de 200 mg; entonces se añadió 1 mL de PBS frío o 0,9 % de NaOH estéril para homogeneizar la muestra fecal / cecal, seguido por mezcla en vórtex durante aproximadamente 1 minuto. La suspensión resultante se diluye 1:1 con PBS y luego se centrifuga a 20.000 g durante 30 min a 4 °C para retirar las partes grandes no deseadas. Se filtró el sobrenadante a través de un filtro de éster de celulosa mixto de 0,8 µm (por ejemplo, filtro Millipore) y el filtrado se conservó a 4 °C hasta uso adicional o se procesó como se describe para la muestra de plasma anteriormente.

Tabla 2. Lista de cebadores y sonda usados para la qPCR para cuantificar niveles de expresión de dianas. Se compraron el miARN de Life Technologies y se sintetizaron cebadores y sonda diseñados internamente por IDT (Integrated DNA Technologies, EE. UU.)

Diana	ID de ensayo / cebadores y sondas (si procede)
miR-155	TM:000479 (Life Technologies N° 4427975)
miR-16	TM:000391 (Life Technologies N° 4427975)
miR-24	TM:000402 (Life Technologies N° 4427975)
miR-206	TM:000510 (Life Technologies N° 4427975)
virX (IDT)	Directo: 5'- TCGTATTCACTGTAGGAGAACAAG -3' Inverso: 5'- TGAGCTTTTCTTGCTTTTCTGC -3' Sonda: 5'- /56-FAM/ ACGATCCAG /ZEN/ TTAGATGCCAGCTTG/3IABkFQ/-3'
NetB (IDT)	Directo: 5'- TGGTGCTGGAATAAATGCTTCA -3' Inverso: 5'- ACCGTCCTTAGTCTCAACAA -3' Sonda: 5'- /56-FAM/ TGATGCAAA /ZEN/ TTTAGCATCATGGGA/3IABkFQ/-3'
Ensayo SybrGreen de SAM (IDT)	Directo: 5'- AAATAAGGAGTTGATAAACATGAAA -3' Inverso: 5'- TGTTACTGGTGAACAACAAAAA -3'
colA (IDT)	Directo: 5'- TGAAAGAACACCAGAGGAAAGT -3' Inverso: 5'- CCTGCAAAGAACTCTGCTGT -3' Sonda: 5'- /56-FAM/ TGATGCAAA /ZEN/ GTGGGGGCAAGGA /3IABkFQ/-3'
Ensayo SybrGreen de CPE0956 (IDT)	Directo: 5'- AATAGGATTTATAGCTGGA -3' Inverso: 5'- AGTTAGTTTTCCAAGGATAG -3'
Ensayo SybrGreen de ARNcp (IDT)	Directo: 5'- TATGTAAGTGGTGTGAGAG -3' Inverso: 5'- ATGAAAATGACTGCTTATC -3'

5 QRT-PCR de ARN derivado de heces / ciego

Se realizó retrotranscripción del ARN fecal y cecal con el kit de síntesis de ADNc SuperScript VILO siguiendo las instrucciones del fabricante y las siguientes modificaciones: la reacción de RT consistió en 11 µL (5x mezcla de reacción VILO), 5,5 µL (10x mezcla de enzimas SS), 5,5 µL (H₂O libre de nucleasa) y 33 µL (ARN). Mientras que el perfil del ciclo de RT consistió en 4 ciclos secuenciales de incubación / mantenimiento a 25 °C durante 10 min, 42 °C durante 60 min, 85 °C durante 5 min y un etapa de mantenimiento final a 4 °C.

Q RT-PCR para plasma y miARN derivado de heces / ciego:

Se realizó por triplicado la retrotranscripción del miARN para cada muestra usando retrotranscripción de ARN usando el kit de retrotranscripción de microARN TaqMan con la siguiente formulación de mezcla maestra para RT y perfil de ciclos: la reacción de RT consistió en 6 µL (conjunto de cebadores de RT), 0,3 µL (dNTP de 100 mM), 1,5 µL (10x tampón de RT), 0,2 µL de inhibidor de RNasa, 3,0 µL de RT MultiScribe y 4 µL (4 µL de ARN para muestras fecales y cecales, y 2 µL de ARN + 2 µL de tampón TE para muestras de plasma). Mientras que el perfil del ciclo de RT consistió en 4 ciclos secuenciales de incubación / mantenimiento a 16 °C durante 30 min, 42 °C durante 30 min, 85 °C durante 5 min y una etapa de mantenimiento final a 4 °C. Se reunió el conjunto de cebadores de RT obtenido por 10 microlitros de cada cebador de RT y se diluyó hasta 1 mL con tampón TE, haciendo que la concentración final de cada cebador de RT 0,05X. Se añadieron cinco veces (5x) del ensayo de miARN personalizado (miR-16, miR-21, miR-24, miR- 155 y miR-206) al conjunto de cebadores de RT respectivo.

QPCR de ARN fecal / cecal

Se realizó qPCR para los ensayos basados en sonda para genes de ARN usando el Rotor-Gene Q de Qiagen, según las instrucciones del fabricante. La temperatura de hibridación de los ensayos de virX, colA y netB fue 57 °C, mientras que la temperatura de hibridación para el análisis de ARNr 16s de *Clostridium perfringens* fue 60 °C. Las reacciones de la mezcla maestra para los ensayos consistieron en 5,5 µL (agua libre de nucleasa), 10 µL (mezcla maestra de PCR TaqMan Fast Universal sin UNG AmpErase), 0,5 µL de cebador directo (20 uM), 1,5 µL de cebador inverso (20

μM), 0,25 μL de sonda (20 μM), 0,25 μL de UNG (uracil-N-glucosilasa) y 2 μL de ADNc. Para la amplificación de ARN 16s, se usó 1 μL de cada uno de directo e inverso.

- 5 Se realizó el kit de PCR Rotor-Gene SYBR Green para ARN no codificante pequeño ARN-VR, e45nt y ARNcp. Las reacciones de mezcla maestra para los ensayos consistieron en 5,75 μL (agua libre de nucleasa), 10 μL (mezcla maestra Rotor Gene SYBR 2x), 0,5 μL de cebador directo (20 μM), 1,5 μL de cebador inverso (20 μM), 0,25 μL de sonda (20 μM), 0,25 μL de UNG (uracil-N-glucosilasa) y 2 μL de ADNc. La amplificación se realizó con la siguiente condición: Primera etapa de mantenimiento a 50 °C durante 2 min, seguido por otro mantenimiento a 95 °C durante 10 y luego 40 ciclos que consisten en 95 °C durante 2 segundos, 60 °C durante 15 s, 72 °C durante 20 s.

Análisis estadístico

- 10 Todos los cálculos estadísticos se realizaron usando el software estadístico R. Como resultado de la estequiometría del ensayo y la eficiencia global de los protocolos analíticos, se imputó con 40 la sustitución de los valores ausentes (sin señal) antes de la normalización, que es el valor de CT posible más alto en una qPCR con 40 ciclos de amplificación. Se calcularon estadísticas moderadas para la comparación por parejas de los grupos de tratamiento con la función lmFit en el paquete limma (limma: modelos lineales para datos de micromatriz, Smyth G.K. en: Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor, Springer, New York, pp 397-420, versión del paquete R 2.16.5) y se ajustaron los valores de *p* resultantes según el método de Benjamini y Hochberg (1995) para obtener los valores de *q* (tasa de falsos descubrimientos)

Análisis multivariante (ANOVA)

- 20 Se examinó cualitativamente la dependencia entre el tiempo, el tratamiento y el tipo de muestra. Se realizó una evaluación cuantitativa formal de posibles asociaciones realizando pruebas de ANOVA bilateral y de Kruskal-Wallis no paramétricas. Ambos métodos se han aplicado independientemente a datos de miARN y ARN bacteriano. Se usó ANOVA bilateral para probar dos efectos principales y una interacción. El primer efecto principal fue el tiempo después del tratamiento (en horas), el segundo efecto principal fue el tipo de tratamiento (control, simulación, dosis alta, dosis baja). Se aplicó por separado la prueba de Kruskal-Wallis al tiempo y al tratamiento, para probar una asociación de estos factores con la expresión génica.
- 25 No se evaluó interacción multivariable por este método. Se analizaron tres tipos de muestras (cecal, excrementos y plasma) para 4 miARN (miR-16, miR-24, miR-155 y miR-206) y estuvieron disponibles un total de 216 datos duplicados. También se analizaron seis dianas bacterianas en dos tipos de muestra (cecal y excrementos) y estuvieron disponible un total de 108 datos duplicados. Se usaron las medias de los datos duplicados (valor de Ct medio de cada muestra) para análisis estadísticos adicionales. El análisis se realizó en tanto los datos sin procesar como los datos normalizados. Se usó miR-191 como normalizados para el análisis de microARN, mientras que los valores de Ct de 16S ARNr de *C. perfringens* se usaron como normalizador para las dianas bacterianas. El modelo lineal de ANOVA (Anova (lm(expresión~tiempo+tratamiento+tiempo*tratamiento))) generó valores de *p* para tres factores (tiempo-efecto, tratamiento-efecto, interacción) para los datos normalizados y sin procesar, mientras que los 2 valores de *p* (tiempo-efecto y tratamiento-efecto) se generaron a partir de los análisis de Kruskal-Wallis para los datos normalizados y sin procesar.

35 Resultados:

Tabla 3. Número de aves muertas por grupo después de la exposición a *C. perfringens*. Murió un ave en cada uno de los grupos: grupo de sonda nasogástrica de baja dosis, grupo de simulación y grupo de control negativo. Murieron 4 aves en el grupo de aves expuestas a alta dosis de *Clostridium perfringens*.

Grupo	Tamaño del grupo inicial	Aves sacrificadas para sangrado días 14 y 15	Aves perdidas después de la inoculación de <i>C. perfringens</i>	AFCR* - después de la exposición	Porcentaje con patología macroscópica típica	Sin signos de pérdida de rendimiento y enfermedad
Sonda nasogástrica de alta dosis	180	54	4	1,60	50,70	49,30%
Sonda nasogástrica de baja dosis	180	54	1	1,60	42,12	57,88%
Simulación	180	54	1	1,57	6,06 ^b	93,94%
Control negativo	180	54	1	1,56	3,13	96,87%
Valor de <i>p</i>			0,200	0,746	<0,001	

* AFCR (relación de conversión de pienso ajustada) determinada como la cantidad de pienso consumido dividida entre el peso corporal de las aves, corregida para mortalidades y aves retiradas debido a la desviación del peso del peso de las aves antes de la exposición

Tabla 4: Marcadores con manifestación significativamente elevada en las vesículas de membrana de excrementos cecales

Marcador	FDR bruta	FDR normalizada
Región Sam	1,21 E-09	9,24E-02
Región de dedos de cinc SWIM	9,52E-09	9,78E-02
ARNcp	3,21 E-05	7,93E-03
Mir206	8,55E-05	9,13E-04
virX	2,95E-04	5,93E-03
netB	1,04E-03	1,30E-03
ARN.VR	2,89E-03	3,21 E-05
colA	6,11 E-03	3,73E-04

5

Tabla 5: Marcadores con manifestación significativamente elevada en vesículas de membrana de excrementos fecales

Marcador	FDR bruta	FDR normalizada
Región Sam	2,63E-11	8,18E-03
ARNcp	8,94E-05	8,64E-04
netB	2,45E-04	2,75E-03
virX	3,24E-03	9,78E-02
colA	5,01 E-03	8,68E-04
Región de dedos de cinc SWIM	5,81 E-02	2,26E-03
VR.ARN	1,36E-01	1,03E-04

Tabla 6: Marcadores con manifestación significativamente elevada en vesículas de membrana de muestras de sangre

Marcador	FDR normalizada
Mir16	6,98E-03
Mir155	1,56E-02
Mir24	9,40E-02

10 Lista de referencias

15

1. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. Curr Protoc Cell Biol., Capítulo 3: Unidad 3.22.
2. Clayton A, Court J, Navabi H, Adams M, Mason MD, Hobot JA, et al. (2001). Analysis of antigen presenting cell derived exosomes, based on immuno-magnetic isolation and flow cytometry. J Immunol. Methods. 2001; 247:163-74.
3. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, et al. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human B cell-derived exosomes. Potential implications for their function and multivesicular body formation. J Biol Chem., 278:10963-72.

4. Kim G, Yoo CE, Kim M, Kang HJ, Park D, Lee M, et al, (2012) Noble polymeric surface conjugated with zwitterionic moieties and antibodies for the isolation of exosomes from human serum. *Bioconjug. Chem.*, 23:2114-20.
5. Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ (2010). Proteomics analysis of A33 immunoaffinity-purified exosomes released from the human colon tumor cell line LIM1215 reveals a tissue-specific protein signature. *Mol. Cell. Proteomics*, 9: 197-208.
6. Smyth G.K (2004) linear models for microarray data In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor*, Springer, New York, pp 397-420.
10. Hochberg and Roy (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Soc. Ser B (Methodological)*, 57:289-300.
8. Heikinheimo, A, and Lindström, M, and Korkeala, H. (2004) Enumeration and Isolation of cpe-Positive *Clostridium perfringens* Spores from Feces. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 9: 3992-3997.
15. Dinh, H., et al., Modulation of microRNAs in two genetically disparate chicken lines showing different necrotic enteritis disease susceptibility. *Vet. Immunol. Immunopathol.* (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.02.003>.
10. Aade, U.P., and Wankhede, H.J, and Kaldete, K.D (2012). Haematological parameters change in *Gallus gallus domesticus* infected with cestode parasite. *International Multidisciplinary Research Journal*, 2(4):13-15.
11. Chuku LC et al. (2012) A comparison of the haematological and biochemical indices of broiler and red jungle (hamburgh) fowl (*Gallus gallus domesticus*), *Discovery Nature*, 2012, 1(1), 15-18.
20. Wang et al. (2012) Integrated analysis of microRNA expression and mRNA transcriptome in lungs of avian influenza virus infected broilers *BMC Genomics* 2012, 13:278.
13. Jiang et al. (2014) Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* type A strains induce innate and adaptive immunity. *International Journal of Medical Microbiology* 304 (2014) 431-443.
25. Obana, et al. (2013) Structural Requirement in *Clostridium perfringens* Collagenase mRNA 5'Leader Sequence for Translational Induction through Small RNA-mRNA Base Pairing *Journal of Bacteriology*, Volume 195 Number 12 p. 2937-2946.
15. Ohtani et al. (2002). Identification of a novel locus that regulates expression of toxin genes in *Clostridium perfringens* *FEMS Microbiology Letters*, 209: 113-118.
30. Nakamura et al. (1995) Small cytoplasmic RNA (scRNA) gene from *Clostridium perfringens* can replace the gene for the *Bacillus subtilis* scRNA in both growth and sporulation *Microbiology* (1995), 141: 2965-2975.
17. KEYBURN et al. (2010) Association between avian necrotic enteritis and *Clostridium perfringens* strains expressing NetB toxin *Vet. Res.* 41:21.
18. Shojadoost et al. (2012). The successful experimental induction of necrotic enteritis in chickens by *Clostridium perfringens*: a critical review *Veterinary Research*, 43:74.
35. Koga et al. (2011) Exosome can prevent RNase from degrading microRNA in feces. *J Gastrointest Oncol* 2011; 2: 215-222.
20. Saleem, Gulbeena (2013) Identification of biochemical markers for sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens (In *Necrotic enteritis, disease induction, predisposing factors and novel biochemical markers in broilers chickens*), Capítulo 8, tesis doctoral, Universidad de Glasgow, R. U.
40. Garcia et al. (2009). Experimental infection of commercial layers using a *Salmonella enterica* serovar Gallinarum strain: Leukogram and serum acute-phase protein concentrations. *Revista Brasileira de Ciência Avícola* 11, 263-270.
22. Piercy (1979). Acute phase responses to experimental salmonellosis in calves and colibacillosis in chickens: serum iron and caeruloplasmin. *Journal of Comparative Pathology* 89, 309-319.
45. Witwer et al. (2013) Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research *Journal of Extracellular Vesicles*, 2: 20360.
24. Nilsson, et al. (2009) Prostate cancer-derived urine exosomes: a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *Br J Cancer*, 100:1603-7.

25. Li et al. (2009) Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. *BMC Cancer*, 9:244.
26. Shao et al. (2012) Protein typing of circulating microvesicles allows real time monitoring of glioblastoma therapy. *Nat Med.*, 18:1835-40.
- 5 27. Taylor and Gercel-Taylor Taylor (2008) MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer *Gynecologic Oncology*, 110 : 13-21.
28. Cheruvanky et al. (2007) Rapid isolation of urinary exosomal biomarkers using a nanomembrane ultrafiltration concentrator. *Am J Physiol Renal Physiol.*, 292: F1657-61.
- 10 29. Miranda et al. (2010) Nucleic acids within urinary exosomes/ microvesicles are potential biomarkers for renal disease. *Kidney Int.*, 78:191-9.
30. Chen et al. (2010) Microfluidic isolation and transcriptome analysis of serum microvesicles. *Lab Chip.*, 10:505-11.
31. Skog et al. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.*, 10:1470-6.
- 15 32. Moore et al. (2008). Clostridium toxin netB (WO 2008/148166).
33. Dhellin et al. (2005). Method for preparing membrane vesicles (documento de patente US6.899.863B1).
34. Lamparski et al. (2004) Method of producing membrane vesicles (documento de patente US6.812.023B1).
35. Abrignani et al. (2007) Method for the preparation of purified HCV RNA by exosome separation (documento de patente US7.198.923B1).
- 20 36. Giorgio (2012) Filter for the removal of micro-vesicles from biological fluids, methods and devices using such a filter (documento de patente EP 2495025 A1).
37. Enderle et al. (2014) methods for isolating microvesicles (documento de patente WO2014/107571).
38. Kyung-Hee et al. (2014) Composition and kit for diagnosing breast cancer including polynucleotide within vesicle, and method of diagnosing breast cancer using the same (documento de patente US 20140178885A1).
- 25 39. Min Soak y Jong-Myeon (2014) Microfluidic apparatus and method of enriching target material in biological sample by using the same (documento de patente EP2740536 A2).

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Evonik Degussa GmbH
- 30 <120> Método de detección de enteritis necrótica aviar
- <130> 201500092
- 35 <160> 17
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 40 <211> 1884
- <212> ADN
- <213> Clostridium perfringens

ES 2 884 215 T3

<220>

<221> CDS

<222> (631)..(1884)

<223> Gen SAM

5

<400> 1

cataaaaaat cactcctttt atatttttaa aaacattatc acttttttat taattatatt	60
caatataatt agtataactg gtcaaaaatt atacataatt ggactgcagc acttatctta	120
tatttaatac caagtttatc ttcttctatt atattaaaaa ttttttctat ataattatat	180
ttattattta ctttaagtatt tagtaaatga attactatac ttctcttcat gattaagctt	240
tatttaaatt tttatatata ttaattaact aaatttaata ctttatttta ctaaaaaaat	300
tatatattgta tttaaataaa aaactactat ttttttagtaa aataaagtat ttataaaaaat	360
attaatatac atttagttta tttttgatat atcaaaaact tttttatttt taaaaaaagt	420
tgataattta atatagttga attttgctat aatatactaa agtttaaata aggagttgat	480
aaacatgaaa tttaaagttt tagaaaaaaa ctttttaact atgtgtgagc caaatttttg	540
ttgttcacca gtaacaaatt tataaaatat tataactaaaa aaactaactc tgatttcac	600
agggttagtt ttctatatgg aggtttttaa atg aaa aaa tca atg tat aat att	654
Met Lys Lys Ser Met Tyr Asn Ile	
1 5	
tat ata caa gga aaa aaa gaa acc gca att ttc aac cta tta aca aga	702
Tyr Ile Gln Gly Lys Lys Glu Thr Ala Ile Phe Asn Leu Leu Thr Arg	
10 15 20	
aat ata att gtt att tca aac aat gaa tat cta aat ttt gat aaa tta	750
Asn Ile Ile Val Ile Ser Asn Asn Glu Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Leu	
25 30 35 40	
ata aat gat gaa gaa tgt aaa gaa caa aaa tct atg ggt ttt tct tta	798
Ile Asn Asp Glu Glu Cys Lys Glu Gln Lys Ser Met Gly Phe Ser Leu	
45 50 55	
gaa aat aat att aat gaa att gaa tta atg aaa tat act tta aat aaa	846
Glu Asn Asn Ile Asn Glu Ile Glu Leu Met Lys Tyr Thr Leu Asn Lys	
60 65 70	

ES 2 884 215 T3

ggt aaa ttt tcc gaa aaa tca atg aca tta ttt tta tca ctc aca aga Gly Lys Phe Ser Glu Lys Ser Met Thr Leu Phe Leu Ser Leu Thr Arg 75 80 85	894
caa tgt aat tta aat tgc att tat tgc tat caa gat aga cga aaa aca Gln Cys Asn Leu Asn Cys Ile Tyr Cys Tyr Gln Asp Arg Arg Lys Thr 90 95 100	942
ttt gat gaa gga aat aat ttt tta aat aaa act gct tgg tta aaa att Phe Asp Glu Gly Asn Asn Phe Leu Asn Lys Thr Ala Trp Leu Lys Ile 105 110 115 120	990
ttt gaa ttt tta aag aaa aaa tct att aat tta aat gaa tta cat ata Phe Glu Phe Leu Lys Lys Lys Ser Ile Asn Leu Asn Glu Leu His Ile 125 130 135	1038
act tta ttt ggt gga gaa cct tta cta aat aaa tca att att tta caa Thr Leu Phe Gly Gly Glu Pro Leu Leu Asn Lys Ser Ile Ile Leu Gln 140 145 150	1086
att att gat gat tta aat tct tta aaa aat caa act cta aaa ata tat Ile Ile Asp Asp Leu Asn Ser Leu Lys Asn Gln Thr Leu Lys Ile Tyr 155 160 165	1134
ata aat tta ata act aat gga gtt ctt tta gat aaa aat ttt tgc gaa Ile Asn Leu Ile Thr Asn Gly Val Leu Leu Asp Lys Asn Phe Cys Glu 170 175 180	1182
aaa ata tat aaa tct ata aat tat att caa att aca ata gat ggt aat Lys Ile Tyr Lys Ser Ile Asn Tyr Ile Gln Ile Thr Ile Asp Gly Asn 185 190 195 200	1230
aaa tca act cat aat caa tta aga gtt ttt cca gat ggt tct gga agc Lys Ser Thr His Asn Gln Leu Arg Val Phe Pro Asp Gly Ser Gly Ser 205 210 215	1278
ttt gat att att tat aat aat tta aag gaa gta att aat cta ttt gaa Phe Asp Ile Ile Tyr Asn Asn Leu Lys Glu Val Ile Asn Leu Phe Glu 220 225 230	1326
aat aaa ata gaa tta aga att aat gta aat aaa gaa ata ata tta aat Asn Lys Ile Glu Leu Arg Ile Asn Val Asn Lys Glu Ile Ile Leu Asn 235 240 245	1374
tgc ttt tct tta ttt aaa aaa tta aag gaa gat tct tta aat aaa agt Cys Phe Ser Leu Phe Lys Lys Leu Lys Glu Asp Ser Leu Asn Lys Ser 250 255 260	1422
ata gcc ata aat tta cat cca att ttt gaa aat caa agc tct ttc gaa Ile Ala Ile Asn Leu His Pro Ile Phe Glu Asn Gln Ser Ser Phe Glu 265 270 275 280	1470
tat ggc tgt aaa aag aat aca gac aaa gac ctt ata tta caa att aat Tyr Gly Cys Lys Lys Asn Thr Asp Lys Asp Leu Ile Leu Gln Ile Asn 285 290 295	1518
gat tta tat aat tat tta tct aaa cat aat ttt aaa ttt aga aaa aac Asp Leu Tyr Asn Tyr Leu Ser Lys His Asn Phe Lys Phe Arg Lys Asn 300 305 310	1566
ttc ata gag ggt cca tgt ata gct aaa cat ata aat agt ttt gct ata Phe Ile Glu Gly Pro Cys Ile Ala Lys His Ile Asn Ser Phe Ala Ile	1614

ES 2 884 215 T3

315	320	325	
gat gaa aat cta aat att tat aaa tgt cca ggc ttt tta tat tct aag			1662
Asp Glu Asn Leu Asn Ile Tyr Lys Cys Pro Gly Phe Leu Tyr Ser Lys			
330	335	340	
tct aat gga ttt ata aat gat att gga gaa ata aac ttt tta gac tct			1710
Ser Asn Gly Phe Ile Asn Asp Ile Gly Glu Ile Asn Phe Leu Asp Ser			
345	350	355	360
gat ttc ttt aaa gaa gta aat tct gaa caa aaa tgt att aat tct tgt			1758
Asp Phe Phe Lys Glu Val Asn Ser Glu Gln Lys Cys Ile Asn Ser Cys			
365	370	375	
ata tat gct cct att tgt tat ggt gga tgt act tgg caa aat aaa tgt			1806
Ile Tyr Ala Pro Ile Cys Tyr Gly Gly Cys Thr Trp Gln Asn Lys Cys			
380	385	390	
aat aaa gag att tta gat tta act tta gaa tca caa tta aaa tct tat			1854
Asn Lys Glu Ile Leu Asp Leu Thr Leu Glu Ser Gln Leu Lys Ser Tyr			
395	400	405	
tta ata tct aga tat aat ttt gaa ata taa			1884
Leu Ile Ser Arg Tyr Asn Phe Glu Ile			
410	415		

<210> 2

<211> 417

5

<212> PRT

<213> Clostridium perfringens

<400> 2

Met Lys Lys Ser Met Tyr Asn Ile Tyr Ile Gln Gly Lys Lys Glu Thr	
1 5 10 15	
Ala Ile Phe Asn Leu Leu Thr Arg Asn Ile Ile Val Ile Ser Asn Asn	
20 25 30	
Glu Tyr Leu Asn Phe Asp Lys Leu Ile Asn Asp Glu Glu Cys Lys Glu	
35 40 45	
Gln Lys Ser Met Gly Phe Ser Leu Glu Asn Asn Ile Asn Glu Ile Glu	
50 55 60	
Leu Met Lys Tyr Thr Leu Asn Lys Gly Lys Phe Ser Glu Lys Ser Met	
65 70 75 80	
Thr Leu Phe Leu Ser Leu Thr Arg Gln Cys Asn Leu Asn Cys Ile Tyr	
85 90 95	
Cys Tyr Gln Asp Arg Arg Lys Thr Phe Asp Glu Gly Asn Asn Phe Leu	
100 105 110	
Asn Lys Thr Ala Trp Leu Lys Ile Phe Glu Phe Leu Lys Lys Lys Ser	

10

ES 2 884 215 T3

115					120					125					
Ile	Asn	Leu	Asn	Glu	Leu	His	Ile	Thr	Leu	Phe	Gly	Gly	Glu	Pro	Leu
130						135					140				
Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Ile	Leu	Gln	Ile	Ile	Asp	Asp	Leu	Asn	Ser	Leu
145					150					155					160
Lys	Asn	Gln	Thr	Leu	Lys	Ile	Tyr	Ile	Asn	Leu	Ile	Thr	Asn	Gly	Val
				165					170					175	
Leu	Leu	Asp	Lys	Asn	Phe	Cys	Glu	Lys	Ile	Tyr	Lys	Ser	Ile	Asn	Tyr
			180					185					190		
Ile	Gln	Ile	Thr	Ile	Asp	Gly	Asn	Lys	Ser	Thr	His	Asn	Gln	Leu	Arg
		195					200					205			
Val	Phe	Pro	Asp	Gly	Ser	Gly	Ser	Phe	Asp	Ile	Ile	Tyr	Asn	Asn	Leu
	210					215					220				
Lys	Glu	Val	Ile	Asn	Leu	Phe	Glu	Asn	Lys	Ile	Glu	Leu	Arg	Ile	Asn
225					230					235					240
Val	Asn	Lys	Glu	Ile	Ile	Leu	Asn	Cys	Phe	Ser	Leu	Phe	Lys	Lys	Leu
				245					250					255	
Lys	Glu	Asp	Ser	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile	Ala	Ile	Asn	Leu	His	Pro	Ile
			260					265					270		
Phe	Glu	Asn	Gln	Ser	Ser	Phe	Glu	Tyr	Gly	Cys	Lys	Lys	Asn	Thr	Asp
		275					280					285			
Lys	Asp	Leu	Ile	Leu	Gln	Ile	Asn	Asp	Leu	Tyr	Asn	Tyr	Leu	Ser	Lys
	290					295					300				
His	Asn	Phe	Lys	Phe	Arg	Lys	Asn	Phe	Ile	Glu	Gly	Pro	Cys	Ile	Ala
305					310					315					320
Lys	His	Ile	Asn	Ser	Phe	Ala	Ile	Asp	Glu	Asn	Leu	Asn	Ile	Tyr	Lys
				325					330					335	
Cys	Pro	Gly	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Ser	Asn	Gly	Phe	Ile	Asn	Asp	Ile
			340					345					350		
Gly	Glu	Ile	Asn	Phe	Leu	Asp	Ser	Asp	Phe	Phe	Lys	Glu	Val	Asn	Ser
		355					360					365			

ES 2 884 215 T3

Glu Gln Lys Cys Ile Asn Ser Cys Ile Tyr Ala Pro Ile Cys Tyr Gly
370 375 380

Gly Cys Thr Trp Gln Asn Lys Cys Asn Lys Glu Ile Leu Asp Leu Thr
385 390 395 400

Ileu Glu Ser Gln Leu Lys Ser Tyr Leu Ile Ser Arg Tyr Asn Phe Glu
405 410 415

Ile

<210> 3

<211> 1679

5 <212> ADN

<213> Clostridium perfringens

<400> 3

ttaaaaatag gttctaacaa ccattttctgt aaacatacca gtaggatttt ttctttggct	60
taaaaagtat tccttttttat ctttaattctt ttcttttgac catctcatat aatcactctc	120
ctaaaatatt atggttatta taataaaaag aaagtatcta aaatagatac tttcttagtt	180
ataaagttgaa atgtgaaaag ctataattat gatataaaaa ctcttaaaaag atacacctta	240
attataactt taaattttaat aaataaacag tatattactc tttatttttc ttaaaaaaat	300
ttagtattgc atttttatct tttctacgtg gaaatgttaa atctaagaac tccatcattt	360
tctttttagt ttgggttcat cctagtattg aagtattctt tagaatattt cctctctttt	420
tgaaaatttc atcttcagta tctctaaatc ttgctttttc tgcagcattt attatacccg	480
cagccatttt tatattatcc tggatttggt tctcgtttaa tgaaccgtta aaattcctaa	540
attcaactgt aggagctcta tctcttgcta tattagttaa gttaatacca taatatataa	600
tttccttcag aaatttttgc tgcctctcct cttacatcct catcattatc catgttgaat	660
cggatatatt tactttcatc ggccctagga ctaaatggag tggcataatg tctggcatta	720
cttcttactc ttccataaatc tccacctgca gctctataaa tacaatcctc atatacttct	780
atagtcttaa aaaatcttct ccattcttgt cttgcagtat ctagttttatc catgtttata	840
tgaacatggc caccgcacct ttgatctact ctagcccat gtcttttagc aacatcacat	900
attattttta ttgtttccca cgtttctgga gtatctttta gaatagggga aactatttct	960
ccgttgcat ctccatcgga tacggaccca tctctctcga gtttccactt acctggctca	1020
cttcttgaat gataacttaa tcttctagga gagcttacta tacctagctc ataaagttct	1080
atggctatag cattaacatc accaccaaca aactcaagtt caactccgaa tgtactattg	1140
tttccgttta gtacgttttc gtactcatat tctatagaat cgtcattaat ttctgcaaaa	1200
tcgttattga aatcagcttc attgtctgta taaaagtgat tatcgtcttg ttcttcccca	1260

10

ES 2 884 215 T3

cgaatatattc tatttatttc atctcttata tttctagctc ttctagtagc ttctacattg	1320
tttatagtat ctacttctgc aacttcgcct aaagcttttc tgaccgctat taagtgtctg	1380
cagcattcat ttctataaac atatttgcca cattcacagc tattttcatt catatcaaca	1440
atgtaagttc cttcttcagt tgaacttact tcatatcgat tattacccaa ggaaactata	1500
tttatatctt caattctgtt tctggttcta gataaccctt gaacagttac aatgttatct	1560
aatctaccat taacagcatt aactaaatct tctattattc cttcagaaag attagatcct	1620
gagccatcaa ttaatccttc cgttgtatatt gcaatagtat tgcttcttct tttaggcat	1679

<210> 4

<211> 268

5 <212> ADN

<213> Clostridium perfringens

<400> 4

gccgtgctag atggggagtt agcgggtgcc tgtaacctgc aatccgctac agcaggatcg	60
aagtcccat agaggctcta acttggtggag tctgccctat gtaagtgggtg ttgagagttg	120
ggccccacgc aatggaaacc tgtgaacctc gtcagggtccg gaaggaagca gcgataagca	180
gtcattttca tgtgccgtgg atacgtctgg cttgagctaa ctgcataggt aacgttcata	240
agttattgtc gaagtgaggt gcacggtt	268

10

<210> 5

<211> 3315

<212> ADN

15 <213> Clostridium perfringens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(3315)

20 <223> Gen colA

<400> 5

ES 2 884 215 T3

atg aag aaa aac tta aaa agg gga gag cta aca aaa ctg aag tta gtt	48
Met Lys Lys Asn Leu Lys Arg Gly Glu Leu Thr Lys Leu Lys Leu Val	
1 5 10 15	
 gaa aga tgg tca gct acc ttt act tta gca gca ttt att tta ttt aat	96
Glu Arg Trp Ser Ala Thr Phe Thr Leu Ala Ala Phe Ile Leu Phe Asn	
20 25 30	
 agc tca ttt aaa gta ttt gca gct gat aaa aag gta gag aat agt aat	144
Ser Ser Phe Lys Val Phe Ala Ala Asp Lys Lys Val Glu Asn Ser Asn	
35 40 45	
 aat gga cag att act aga gag att aat gct gat cag att tct aaa aca	192
Asn Gly Gln Ile Thr Arg Glu Ile Asn Ala Asp Gln Ile Ser Lys Thr	
50 55 60	
 gaa tta aat aat gag gta gct aca gac aat aat aga cca tta gga cct	240
Glu Leu Asn Asn Glu Val Ala Thr Asp Asn Asn Arg Pro Leu Gly Pro	

ES 2 884 215 T3

65	70	75	80	
agt att gct cca tca aga gca aga aac aac aag atc tat aca ttc gat Ser Ile Ala Pro Ser Arg Ala Arg Asn Asn Lys Ile Tyr Thr Phe Asp 85 90 95				288
gaa ctt aac aga atg aat tat agt gat cta gtt gaa tta ata aaa aca Glu Leu Asn Arg Met Asn Tyr Ser Asp Leu Val Glu Leu Ile Lys Thr 100 105 110				336
ata agt tat gaa aac gta cca gac tta ttt aat ttt aat gat ggt tca Ile Ser Tyr Glu Asn Val Pro Asp Leu Phe Asn Phe Asn Asp Gly Ser 115 120 125				384
tat act ttc ttt agt aat aga gat cgt gta caa gct ata ata tat ggt Tyr Thr Phe Phe Ser Asn Arg Asp Arg Val Gln Ala Ile Ile Tyr Gly 130 135 140				432
cta gag gat agt gga aga act tat aca gca gat gat gat aag gga att Leu Glu Asp Ser Gly Arg Thr Tyr Thr Ala Asp Asp Asp Lys Gly Ile 145 150 155 160				480
cca act tta gtt gag ttt tta aga gct gga tat tat tta gga ttt tat Pro Thr Leu Val Glu Phe Leu Arg Ala Gly Tyr Tyr Leu Gly Phe Tyr 165 170 175				528
aat aaa caa tta tca tac cta aat aca cca cag tta aaa aat gag tgt Asn Lys Gln Leu Ser Tyr Leu Asn Thr Pro Gln Leu Lys Asn Glu Cys 180 185 190				576
tta cca gct atg aaa gcg att caa tat aat agt aat ttt aga tta gga Leu Pro Ala Met Lys Ala Ile Gln Tyr Asn Ser Asn Phe Arg Leu Gly 195 200 205				624
aca aag gcg caa gat gga gtt gtt gag gct tta gga aga ctt ata ggt Thr Lys Ala Gln Asp Gly Val Val Glu Ala Leu Gly Arg Leu Ile Gly 210 215 220				672
aat gct tca gca gat cca gaa gtt att aat aat tgc ata tat gtt tta Asn Ala Ser Ala Asp Pro Glu Val Ile Asn Asn Cys Ile Tyr Val Leu 225 230 235 240				720
agt gat ttt aaa gat aat ata gat aag tat ggt tct aac tat agc aag Ser Asp Phe Lys Asp Asn Ile Asp Lys Tyr Gly Ser Asn Tyr Ser Lys 245 250 255				768
gga aat gca gta ttc aac ctt atg aaa ggt att gat tat tat act aat Gly Asn Ala Val Phe Asn Leu Met Lys Gly Ile Asp Tyr Tyr Thr Asn 260 265 270				816
tca gta ata tac aat act aag gga tat gat gct aaa aac act gag ttc Ser Val Ile Tyr Asn Thr Lys Gly Tyr Asp Ala Lys Asn Thr Glu Phe 275 280 285				864
tat aat aga ata gat cca tat atg gaa aga tta gaa agt tta tgt aca Tyr Asn Arg Ile Asp Pro Tyr Met Glu Arg Leu Glu Ser Leu Cys Thr 290 295 300				912
ata ggt gat aag tta aat aat gat aat gct tgg ctt gta aat aat gcc Ile Gly Asp Lys Leu Asn Asn Asp Asn Ala Trp Leu Val Asn Asn Ala 305 310 315 320				960
tta tat tac aca ggt aga atg ggt aag ttt aga gaa gac cca tca ata				1008

ES 2 884 215 T3

Leu	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Arg	Met	Gly	Lys	Phe	Arg	Glu	Asp	Pro	Ser	Ile	
				325					330					335		
tct	caa	aga	gct	tta	gaa	aga	gct	atg	aag	gag	tat	cct	tat	tta	tca	1056
Ser	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Arg	Ala	Met	Lys	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Ser	
			340					345					350			
tat	caa	tat	att	gaa	gct	gcc	aat	gat	tta	gat	tta	aat	ttt	ggg	ggc	1104
Tyr	Gln	Tyr	Ile	Glu	Ala	Ala	Asn	Asp	Leu	Asp	Leu	Asn	Phe	Gly	Gly	
			355				360						365			
aaa	aat	tca	tca	gga	aat	gat	ata	gat	ttc	aat	aag	ata	aaa	gca	gat	1152
Lys	Asn	Ser	Ser	Gly	Asn	Asp	Ile	Asp	Phe	Asn	Lys	Ile	Lys	Ala	Asp	
			370				375					380				
gca	agg	gaa	aaa	tat	ctt	cca	aaa	aca	tat	act	ttt	gat	gat	ggg	aaa	1200
Ala	Arg	Glu	Lys	Tyr	Leu	Pro	Lys	Thr	Tyr	Thr	Phe	Asp	Asp	Gly	Lys	
					390						395				400	
ttt	gta	gta	aaa	gct	ggg	gat	aaa	gta	aca	gaa	gag	aag	ata	aaa	aga	1248
Phe	Val	Val	Lys	Ala	Gly	Asp	Lys	Val	Thr	Glu	Glu	Lys	Ile	Lys	Arg	
				405					410					415		
tta	tat	tgg	gct	tca	aag	gaa	gtt	aag	gct	caa	ttc	atg	aga	gta	gtt	1296
Leu	Tyr	Trp	Ala	Ser	Lys	Glu	Val	Lys	Ala	Gln	Phe	Met	Arg	Val	Val	
			420					425					430			
caa	aat	gat	aag	gct	tta	gaa	gag	gga	aat	cca	gat	gat	att	tta	act	1344
Gln	Asn	Asp	Lys	Ala	Leu	Glu	Gly	Asn	Pro	Asp	Asp	Ile	Leu	Thr		
			435				440					445				
gtt	gtt	att	tat	aac	tca	cca	gaa	gag	tat	aag	tta	aat	cgt	ata	ata	1392
Val	Val	Ile	Tyr	Asn	Ser	Pro	Glu	Glu	Tyr	Lys	Leu	Asn	Arg	Ile	Ile	
			450			455					460					
aat	gga	ttt	agt	act	gat	aat	ggg	ggg	ata	tat	att	gaa	aac	ata	gga	1440
Asn	Gly	Phe	Ser	Thr	Asp	Asn	Gly	Gly	Ile	Tyr	Ile	Glu	Asn	Ile	Gly	
				470					475					480		
act	ttc	ttt	act	tat	gaa	aga	aca	cca	gag	gaa	agt	ata	tat	aca	tta	1488
Thr	Phe	Phe	Thr	Tyr	Glu	Arg	Thr	Pro	Glu	Glu	Ser	Ile	Tyr	Thr	Leu	
				485					490					495		
gaa	gaa	tta	ttc	cgt	cat	gaa	ttt	act	cac	tat	ctt	caa	ggg	aga	tat	1536
Glu	Glu	Leu	Phe	Arg	His	Glu	Phe	Thr	His	Tyr	Leu	Gln	Gly	Arg	Tyr	
			500					505					510			
gta	gtt	cct	gga	atg	tgg	ggg	caa	gga	gaa	ttc	tat	caa	gag	gga	gtt	1584
Val	Val	Pro	Gly	Met	Trp	Gly	Gln	Gly	Glu	Phe	Tyr	Gln	Glu	Gly	Val	
			515				520						525			
tta	act	tgg	tat	gaa	gaa	gga	aca	gca	gag	ttc	ttt	gca	ggg	tca	act	1632
Leu	Thr	Trp	Tyr	Glu	Glu	Gly	Thr	Ala	Glu	Phe	Phe	Ala	Gly	Ser	Thr	
			530				535					540				
aga	act	gat	gga	ata	aaa	cca	aga	aaa	tca	gtt	aca	caa	ggg	tta	gct	1680
Arg	Thr	Asp	Gly	Ile	Lys	Pro	Arg	Lys	Ser	Val	Thr	Gln	Gly	Leu	Ala	
					550					555				560		
tac	gat	aga	aat	aat	aga	atg	tct	tta	tat	ggg	gta	tta	cat	gct	aaa	1728
Tyr	Asp	Arg	Asn	Asn	Arg	Met	Ser	Leu	Tyr	Gly	Val	Leu	His	Ala	Lys	
				565					570					575		

ES 2 884 215 T3

tat ggc tca tgg gat ttc tat aat tat gga ttt gct cta tca aac tac Tyr Gly Ser Trp Asp Phe Tyr Asn Tyr Gly Phe Ala Leu Ser Asn Tyr 580 585 590	1776
atg tac aac aat aac atg gga atg ttt aat aag atg aca aat tac ata Met Tyr Asn Asn Asn Met Gly Met Phe Asn Lys Met Thr Asn Tyr Ile 595 600 605	1824
aag aat aat gat gta tct ggt tat aaa gat tat att gca tca atg agt Lys Asn Asn Asp Val Ser Gly Tyr Lys Asp Tyr Ile Ala Ser Met Ser 610 615 620	1872
agt gat tac gga tta aat gat aaa tat caa gac tat atg gat tct tta Ser Asp Tyr Gly Leu Asn Asp Lys Tyr Gln Asp Tyr Met Asp Ser Leu 625 630 635 640	1920
tta aac aat att gat aac tta gat gtt cct tta gtt tca gat gag tat Leu Asn Asn Ile Asp Asn Leu Asp Val Pro Leu Val Ser Asp Glu Tyr 645 650 655	1968
gta aat gga cat gaa gct aag gat ata aat gaa ata act aat gac ata Val Asn Gly His Glu Ala Lys Asp Ile Asn Glu Ile Thr Asn Asp Ile 660 665 670	2016
aaa gaa gtt tca aat ata aaa gat ctt tct agt aat gtt gaa aag tct Lys Glu Val Ser Asn Ile Lys Asp Leu Ser Ser Asn Val Glu Lys Ser 675 680 685	2064
caa ttc ttt act act tac gat atg aga gga aca tat gta ggg gga aga Gln Phe Phe Thr Thr Tyr Asp Met Arg Gly Thr Tyr Val Gly Gly Arg 690 695 700	2112
agt caa ggg gaa gaa aat gac tgg aaa gat atg aat tct aag tta aat Ser Gln Gly Glu Glu Asn Asp Trp Lys Asp Met Asn Ser Lys Leu Asn 705 710 715 720	2160
gat atg tta aaa gaa tta tct aaa aag agc tgg aat ggt tat aaa act Asp Met Leu Lys Glu Leu Ser Lys Lys Ser Trp Asn Gly Tyr Lys Thr 725 730 735	2208
gtt act gca tac ttt gta aac cat aaa gta gat gaa aat ggt aac tat Val Thr Ala Tyr Phe Val Asn His Lys Val Asp Glu Asn Gly Asn Tyr 740 745 750	2256
gtt tat gat gtt gta ttc cat gga atg aat aca gat aca aat act gat Val Tyr Asp Val Val Phe His Gly Met Asn Thr Asp Thr Asn Thr Asp 755 760 765	2304
gtt cat gtt aat aaa gag cct aag gct gtt ata aaa tct gat tct tca Val His Val Asn Lys Glu Pro Lys Ala Val Ile Lys Ser Asp Ser Ser 770 775 780	2352
gta ata gtt gaa gaa gaa att aat ttt gat gga aca gag tca aag gat Val Ile Val Glu Glu Glu Ile Asn Phe Asp Gly Thr Glu Ser Lys Asp 785 790 795 800	2400
gaa gat ggt gaa atc aaa gct tat gaa tgg gac ttt gga gat gga gaa Glu Asp Gly Glu Ile Lys Ala Tyr Glu Trp Asp Phe Gly Asp Gly Glu 805 810 815	2448
aaa tct aat gag gct aaa gcc act cat aag tat aat aaa act gga gaa Lys Ser Asn Glu Ala Lys Ala Thr His Lys Tyr Asn Lys Thr Gly Glu 820 825 830	2496

ES 2 884 215 T3

tat gaa gta aaa tta aca gtt aca gat aat aac ggt gga ata aat act Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val Thr Asp Asn Asn Gly Gly Ile Asn Thr 835 840 845	2544
gaa agt aaa aag ata aaa gta gta gaa gat aaa cct gtt gaa gtt ata Glu Ser Lys Lys Ile Lys Val Val Glu Asp Lys Pro Val Glu Val Ile 850 855 860	2592
aat gaa agc gag cca aac aat gat ttt gaa aag gct aac caa ata gct Asn Glu Ser Glu Pro Asn Asn Asp Phe Glu Lys Ala Asn Gln Ile Ala 865 870 875 880	2640
aaa tct aat atg tta gtt aag ggt act tta tca gaa gag gat tat tca Lys Ser Asn Met Leu Val Lys Gly Thr Leu Ser Glu Glu Asp Tyr Ser 885 890 895	2688
gat aaa tat tat ttt gat gta gct aaa aaa ggc aat gtt aaa atc act Asp Lys Tyr Tyr Phe Asp Val Ala Lys Lys Gly Asn Val Lys Ile Thr 900 905 910	2736
ctt aat aat tta aat tca gta gga ata act tgg aca ctt tat aaa gag Leu Asn Asn Leu Asn Ser Val Gly Ile Thr Trp Thr Leu Tyr Lys Glu 915 920 925	2784
gga gac cta aac aat tat gtt tta tat gca act gga aat gat gga aca Gly Asp Leu Asn Asn Tyr Val Leu Tyr Ala Thr Gly Asn Asp Gly Thr 930 935 940	2832
gaa tta aag ggt gaa aag act tta gag cct gga aga tac tac tta agt Glu Leu Lys Gly Glu Lys Thr Leu Glu Pro Gly Arg Tyr Tyr Leu Ser 945 950 955 960	2880
gta tat act tat gat aat caa tca gga gct tac aca gta aat gta aaa Val Tyr Thr Tyr Asp Asn Gln Ser Gly Ala Tyr Thr Val Asn Val Lys 965 970 975	2928
gga aac ctt aaa aat gaa gtt aaa gaa aca gaa aag gat gct ata aaa Gly Asn Leu Lys Asn Glu Val Lys Glu Thr Glu Lys Asp Ala Ile Lys 980 985 990	2976
gaa gtt gaa aat aac aat gat ttt gat aaa gct atg aag gta gac agt Glu Val Glu Asn Asn Asn Asp Phe Asp Lys Ala Met Lys Val Asp Ser 995 1000 1005	3024
aat agc aaa ata gtt gga aca tta agc aat gat gat ctt aag gat Asn Ser Lys Ile Val Gly Thr Leu Ser Asn Asp Asp Leu Lys Asp 1010 1015 1020	3069
att tat agc ata gat ata caa aat cca agt gac tta aac ata gta Ile Tyr Ser Ile Asp Ile Gln Asn Pro Ser Asp Leu Asn Ile Val 1025 1030 1035	3114
gtt gaa aac tta gat aat ata aaa atg aac tgg tta tta tat tca Val Glu Asn Leu Asp Asn Ile Lys Met Asn Trp Leu Leu Tyr Ser 1040 1045 1050	3159
gct gat gat tta agt aac tat gtg gat tac gct aat gca gat gga Ala Asp Asp Leu Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Asn Ala Asp Gly 1055 1060 1065	3204
aat aaa tta agt aac act tgt aag tta aat cca ggt aaa tat tac Asn Lys Leu Ser Asn Thr Cys Lys Leu Asn Pro Gly Lys Tyr Tyr 1070 1075 1080	3249
tta tgt gtt tat caa ttt gaa aac tca ggt act gga aat tac aca Leu Cys Val Tyr Gln Phe Glu Asn Ser Gly Thr Gly Asn Tyr Thr 1085 1090 1095	3294
gta aac tta caa aac aaa taa Val Asn Leu Gln Asn Lys 1100	3315

ES 2 884 215 T3

<210> 6

<211> 1104

<212> PRT

<213> Clostridium perfringens

5

<400> 6

```

Met Lys Lys Asn Leu Lys Arg Gly Glu Leu Thr Lys Leu Lys Leu Val
 1           5           10           15

Glu Arg Trp Ser Ala Thr Phe Thr Leu Ala Ala Phe Ile Leu Phe Asn
 20           25           30

Ser Ser Phe Lys Val Phe Ala Ala Asp Lys Lys Val Glu Asn Ser Asn
 35           40           45

Asn Gly Gln Ile Thr Arg Glu Ile Asn Ala Asp Gln Ile Ser Lys Thr
 50           55           60

Glu Leu Asn Asn Glu Val Ala Thr Asp Asn Asn Arg Pro Leu Gly Pro
 65           70           75           80

Ser Ile Ala Pro Ser Arg Ala Arg Asn Asn Lys Ile Tyr Thr Phe Asp
 85           90           95

Glu Leu Asn Arg Met Asn Tyr Ser Asp Leu Val Glu Leu Ile Lys Thr
100           105           110

Ile Ser Tyr Glu Asn Val Pro Asp Leu Phe Asn Phe Asn Asp Gly Ser
115           120           125

Tyr Thr Phe Phe Ser Asn Arg Asp Arg Val Gln Ala Ile Ile Tyr Gly
130           135           140

Leu Glu Asp Ser Gly Arg Thr Tyr Thr Ala Asp Asp Asp Lys Gly Ile
145           150           155           160

Pro Thr Leu Val Glu Phe Leu Arg Ala Gly Tyr Tyr Leu Gly Phe Tyr
165           170           175

Asn Lys Gln Leu Ser Tyr Leu Asn Thr Pro Gln Leu Lys Asn Glu Cys

```

ES 2 884 215 T3

180										185					190				
Leu	Pro	Ala	Met	Lys	Ala	Ile	Gln	Tyr	Asn	Ser	Asn	Phe	Arg	Leu	Gly				
		195					200					205							
Thr	Lys	Ala	Gln	Asp	Gly	Val	Val	Glu	Ala	Leu	Gly	Arg	Leu	Ile	Gly				
	210					215					220								
Asn	Ala	Ser	Ala	Asp	Pro	Glu	Val	Ile	Asn	Asn	Cys	Ile	Tyr	Val	Leu				
225					230					235					240				
Ser	Asp	Phe	Lys	Asp	Asn	Ile	Asp	Lys	Tyr	Gly	Ser	Asn	Tyr	Ser	Lys				
				245					250					255					
Gly	Asn	Ala	Val	Phe	Asn	Leu	Met	Lys	Gly	Ile	Asp	Tyr	Tyr	Thr	Asn				
			260					265					270						
Ser	Val	Ile	Tyr	Asn	Thr	Lys	Gly	Tyr	Asp	Ala	Lys	Asn	Thr	Glu	Phe				
		275					280					285							
Tyr	Asn	Arg	Ile	Asp	Pro	Tyr	Met	Glu	Arg	Leu	Glu	Ser	Leu	Cys	Thr				
	290					295					300								
Ile	Gly	Asp	Lys	Leu	Asn	Asn	Asp	Asn	Ala	Trp	Leu	Val	Asn	Asn	Ala				
305					310					315					320				
Leu	Tyr	Tyr	Thr	Gly	Arg	Met	Gly	Lys	Phe	Arg	Glu	Asp	Pro	Ser	Ile				
				325					330					335					
Ser	Gln	Arg	Ala	Leu	Glu	Arg	Ala	Met	Lys	Glu	Tyr	Pro	Tyr	Leu	Ser				
			340					345					350						
Tyr	Gln	Tyr	Ile	Glu	Ala	Ala	Asn	Asp	Leu	Asp	Leu	Asn	Phe	Gly	Gly				
		355					360					365							
Lys	Asn	Ser	Ser	Gly	Asn	Asp	Ile	Asp	Phe	Asn	Lys	Ile	Lys	Ala	Asp				
	370					375					380								
Ala	Arg	Glu	Lys	Tyr	Leu	Pro	Lys	Thr	Tyr	Thr	Phe	Asp	Asp	Gly	Lys				
385					390					395					400				
Phe	Val	Val	Lys	Ala	Gly	Asp	Lys	Val	Thr	Glu	Glu	Lys	Ile	Lys	Arg				
				405					410					415					
Leu	Tyr	Trp	Ala	Ser	Lys	Glu	Val	Lys	Ala	Gln	Phe	Met	Arg	Val	Val				
			420					425					430						

ES 2 884 215 T3

Gln Asn Asp Lys Ala Leu Glu Glu Gly Asn Pro Asp Asp Ile Leu Thr
 435 440 445
 Val Val Ile Tyr Asn Ser Pro Glu Glu Tyr Lys Leu Asn Arg Ile Ile
 450 455 460
 Asn Gly Phe Ser Thr Asp Asn Gly Gly Ile Tyr Ile Glu Asn Ile Gly
 465 470 475 480
 Thr Phe Phe Thr Tyr Glu Arg Thr Pro Glu Glu Ser Ile Tyr Thr Leu
 485 490 495
 Glu Glu Leu Phe Arg His Glu Phe Thr His Tyr Leu Gln Gly Arg Tyr
 500 505 510
 Val Val Pro Gly Met Trp Gly Gln Gly Glu Phe Tyr Gln Glu Gly Val
 515 520 525
 Leu Thr Trp Tyr Glu Glu Gly Thr Ala Glu Phe Phe Ala Gly Ser Thr
 530 535 540
 Arg Thr Asp Gly Ile Lys Pro Arg Lys Ser Val Thr Gln Gly Leu Ala
 545 550 555 560
 Tyr Asp Arg Asn Asn Arg Met Ser Leu Tyr Gly Val Leu His Ala Lys
 565 570 575
 Tyr Gly Ser Trp Asp Phe Tyr Asn Tyr Gly Phe Ala Leu Ser Asn Tyr
 580 585 590
 Met Tyr Asn Asn Asn Met Gly Met Phe Asn Lys Met Thr Asn Tyr Ile
 595 600 605
 Lys Asn Asn Asp Val Ser Gly Tyr Lys Asp Tyr Ile Ala Ser Met Ser
 610 615 620
 Ser Asp Tyr Gly Leu Asn Asp Lys Tyr Gln Asp Tyr Met Asp Ser Leu
 625 630 635 640
 Leu Asn Asn Ile Asp Asn Leu Asp Val Pro Leu Val Ser Asp Glu Tyr
 645 650 655
 Val Asn Gly His Glu Ala Lys Asp Ile Asn Glu Ile Thr Asn Asp Ile
 660 665 670
 Lys Glu Val Ser Asn Ile Lys Asp Leu Ser Ser Asn Val Glu Lys Ser
 675 680 685

ES 2 884 215 T3

Gln Phe Phe Thr Thr Tyr Asp Met Arg Gly Thr Tyr Val Gly Gly Arg
 690 695 700
 Ser Gln Gly Glu Glu Asn Asp Trp Lys Asp Met Asn Ser Lys Leu Asn
 705 710 715 720
 Asp Met Leu Lys Glu Leu Ser Lys Lys Ser Trp Asn Gly Tyr Lys Thr
 725 730 735
 Val Thr Ala Tyr Phe Val Asn His Lys Val Asp Glu Asn Gly Asn Tyr
 740 745 750
 Val Tyr Asp Val Val Phe His Gly Met Asn Thr Asp Thr Asn Thr Asp
 755 760 765
 Val His Val Asn Lys Glu Pro Lys Ala Val Ile Lys Ser Asp Ser Ser
 770 775 780
 Val Ile Val Glu Glu Glu Ile Asn Phe Asp Gly Thr Glu Ser Lys Asp
 785 790 795 800
 Glu Asp Gly Glu Ile Lys Ala Tyr Glu Trp Asp Phe Gly Asp Gly Glu
 805 810 815
 Lys Ser Asn Glu Ala Lys Ala Thr His Lys Tyr Asn Lys Thr Gly Glu
 820 825 830
 Tyr Glu Val Lys Leu Thr Val Thr Asp Asn Asn Gly Gly Ile Asn Thr
 835 840 845
 Glu Ser Lys Lys Ile Lys Val Val Glu Asp Lys Pro Val Glu Val Ile
 850 855 860
 Asn Glu Ser Glu Pro Asn Asn Asp Phe Glu Lys Ala Asn Gln Ile Ala
 865 870 875 880
 Lys Ser Asn Met Leu Val Lys Gly Thr Leu Ser Glu Glu Asp Tyr Ser
 885 890 895
 Asp Lys Tyr Tyr Phe Asp Val Ala Lys Lys Gly Asn Val Lys Ile Thr
 900 905 910
 Leu Asn Asn Leu Asn Ser Val Gly Ile Thr Trp Thr Leu Tyr Lys Glu
 915 920 925
 Gly Asp Leu Asn Asn Tyr Val Leu Tyr Ala Thr Gly Asn Asp Gly Thr
 930 935 940

ES 2 884 215 T3

Glu Leu Lys Gly Glu Lys Thr Leu Glu Pro Gly Arg Tyr Tyr Leu Ser
 945 950 955 960
 Val Tyr Thr Tyr Asp Asn Gln Ser Gly Ala Tyr Thr Val Asn Val Lys
 965 970 975
 Gly Asn Leu Lys Asn Glu Val Lys Glu Thr Glu Lys Asp Ala Ile Lys
 980 985 990
 Glu Val Glu Asn Asn Asn Asp Phe Asp Lys Ala Met Lys Val Asp Ser
 995 1000 1005
 Asn Ser Lys Ile Val Gly Thr Leu Ser Asn Asp Asp Leu Lys Asp
 1010 1015 1020
 Ile Tyr Ser Ile Asp Ile Gln Asn Pro Ser Asp Leu Asn Ile Val
 1025 1030 1035
 Val Glu Asn Leu Asp Asn Ile Lys Met Asn Trp Leu Leu Tyr Ser
 1040 1045 1050
 Ala Asp Asp Leu Ser Asn Tyr Val Asp Tyr Ala Asn Ala Asp Gly
 1055 1060 1065
 Asn Lys Leu Ser Asn Thr Cys Lys Leu Asn Pro Gly Lys Tyr Tyr
 1070 1075 1080
 Leu Cys Val Tyr Gln Phe Glu Asn Ser Gly Thr Gly Asn Tyr Thr
 1085 1090 1095
 Val Asn Leu Gln Asn Lys
 1100

<210> 7

<211> 1001

5 <212> ADN

<213> Clostridium perfringens

<400> 7

tcaaaataga gtgcttttac ttataaaact taatatatatt attcctaaaa tatcagataa 60
 aattaagact atgttatata taatgagaag gaaattaaat attttttagta ttttatttat 120
 tatcttttca gtttttgatc cagttttaat ttgggctatt ttaaagttag ttttccaagg 180
 atagaaaagt tctattcctt ctgaagttaa aaaatctaaa actaagtggg atatatatcc 240
 agctataaat cctattgaaa ttattaataa tattatgttg aagttactaa catttaaaat 300
 aatatataag gttaatacta ttaaagatag acatagtaaa ctatgagtaa agccacgatg 360

10

ES 2 884 215 T3

```

tctacattta ctacctatat gctttgaaag aaaaggatac atttgactaa ttgaagattt 420
tctttgatct atatcaggaa atagagatcc tatataagaa aaatgaaaaa ataatgctat 480
taataaaatt ttataagcta tatcatatgg aaataagaac aggcttaaaa ttgtatttaa 540
cattattaaa gaaatgcata cgcctccagt tgaatgagtt tcttttgtca taaaatctcc 600
tttaaaaata attatcatta gtttatatta aaaatattat cataatattc attttacata 660
aagaagaaaa aaataaaaat cctaaaaata gagtggacag ttctatttct aggatcaata 720
gttatggtgg taattttatg taaggttttt tactaaatta aagtaaaatc attaataagt 780
aattatttat ttttaattac aattatggaa tatgcaattg aaaatattga tattaagca 840
agtatgggac ttataatatt tgaaacaact tctaaagatg taaaataaga tactctttgt 900
tcaatatata aagctatgct atttttaagt attaaggag aaaaaagagt tattaatgta 960
attaaaattg cacttgttaa aatccttttt gtatgtttca a 1001

```

<210> 8

<211> 960

5

<212> ADN

<213> Clostridium perfringens

<220>

<221> característica_misc

10

<222> (527)..(527)

<223> n es a, c, g, t o u

<400> 8

ES 2 884 215 T3

```

ttacagataa tattctatct tatgatcttg ccaattttatt ttaaacataa attcgttata      60
ttcacttggt gacgaaagt tgtttgttcc tcgccattga gtagtttccc aatttaaaat      120
atagtcatta tcaaactctt gatattcaac tattattaca gattcttttag catttttagg      180
tgctgttaat gctaaagcca tattgggtga aaatccacca gaaattaatg ttgataaatc      240
tctatcatct gtgaaatctt tatcaccatt attatacaat cttgatttca tgaataattg      300
atttcataa atagcatgat aagaatctat attataaccg tccttagtct caacaaattt      360
tatatcccat gatgctaaat ttgcatcatc ttttctttga attgttctaa aatcagggtg      420
ttcatagctt atagtatttt ggacattata tgaagcattt attccagcac cagcagtttt      480
tccttcaaca gatataattac cgcctataga ataaccaatt gaattanata catctttttt      540
atctatagtt ttaggaatag aatttgctat attattatct acatcagcac tttttacatt      600
aattctataa gtttcaggcc atttcatttt tccgtaatat ttagaaccaa aaatctgttt      660
atcagaaggt ataaatcctt ctaaatttaa taaagcagtt ttcttatcag aatgaggatc      720
ttcaataaat gttccactta aagttgcctt ccaaccttta tgtgaagcgg tatcactaga      780
agtataatta atagcttcct ttccattttc ttttattatt tctccactta gatttttcaa      840
ctcaatcttg tttatgtcat ttaattcact tgcaaaaact tgagtttgag ttgaaaaaag      900
gcttgacta attacacttg taagaactag tgtaattgaa ataattttta atcttttcaa      960

```

<210> 9

5

<211> 562

<212> ADN

<213> Clostridium perfringens

<400> 9

10

```

tgtttatcat cccttttctc tcatttttat atactcataa atatatcata aaaagcaaaa      60
tctatccata atatatctaa aaaatgagta tatagttttt aataaaatta tatttaatta      120
tgtataaaaa tcataagtta aattgctcta tataatatct ccaaataaga ttaattttat      180
gaaatagaaa tgaaaaaagt tctgcaaagt gcagaacttt taatttatga ataaacttgc      240
gttaattatc aattatctat tcattttttg agcttttctt gcttttctgc aagctgggca      300
tctaactgga tcgttttcaa atcctttttc tttgaagaat tcttggtctc ctacagtga      360
tacgaattct tttccacagt ctttacaac taaattttta tcttccattt cttttacctc      420
ctgtaaaatt tactaggtac gtttgagatc tatactataa aactaataaa ataaatttta      480
caggacagaa ataaagtaca tatctactaa attttatttt atatatgat tatatcatat      540
agaaaaaaga atacaatact tt                                     562

```

<210> 10

ES 2 884 215 T3

	<211> 84		
	<212> ARN		
	<213> Gallus gallus		
5	<400> 10		
	gucugucaua cucuagcagc acguaaaauu ugguguuaaa acuguaaaau ucuccaguau	60	
	uaacugugcu gcugaaguaa ggcu	84	
	<210> 11		
10	<211> 68		
	<212> ARN		
	<213> Gallus gallus		
	<400> 11		
15	cuccggugcc uacugagcug auaucaguuc ugauuuuaca uacuggcuca guucagcagg	60	
	aacaggag	68	
	<210> 12		
	<211> 63		
20	<212> ARN		
	<213> Gallus gallus		
	<400> 12		
25	uguuaaugcu aaucgugaua gggguuuuuu ccucugaaug acuccuacau guuagcauuu	60	
	aca	63	
	<210> 13		
	<211> 76		
30	<212> ARN		
	<213> Gallus gallus		
	<400> 13		

ES 2 884 215 T3

gagaugacau gcuucuuuau auccccaauau ggauuaggcu gcuauggaau guaaggaagu 60
gugugguuuc agggag 76

<210> 14

<211> 77

5 <212> PRT

<213> Clostridium perfringens

<400> 14

Met Lys Glu Ile Ile Tyr Tyr Gly Ile Asn Leu Thr Asn Ile Ala Arg
1 5 10 15

Asp Arg Ala Pro Thr Val Glu Phe Arg Asn Phe Asn Gly Ser Leu Asn
20 25 30

Glu Lys Gln Ile Gln Asp Asn Ile Lys Met Ala Ala Gly Ile Ile Asn
35 40 45

Ala Ala Glu Lys Ala Arg Phe Arg Asp Thr Glu Asp Glu Ile Phe Lys
50 55 60

10 Lys Arg Gly Asn Ile Leu Lys Asn Thr Ser Ile Leu Gly
65 70 75

<210> 15

<211> 196

<212> PRT

15 <213> Clostridium perfringens

<400> 15

Met Thr Lys Glu Thr His Ser Thr Gly Gly Val Cys Ile Ser Leu Ile
1 5 10 15

Met Leu Asn Thr Ile Leu Ser Leu Phe Leu Phe Pro Tyr Asp Ile Ala
20 25 30

Tyr Lys Ile Leu Leu Ile Ala Leu Phe Phe His Phe Ser Tyr Ile Gly
35 40 45

Ser Leu Phe Pro Asp Ile Asp Gln Arg Lys Ser Ser Ile Ser Gln Met
50 55 60

ES 2 884 215 T3

Tyr Pro Phe Leu Ser Lys His Ile Gly Ser Lys Cys Arg His Arg Gly
 65 70 75 80
 Phe Thr His Ser Leu Leu Cys Leu Ser Leu Ile Val Leu Thr Leu Tyr
 85 90 95
 Ile Ile Leu Asn Val Ser Asn Phe Asn Ile Ile Leu Leu Ile Ile Ser
 100 105 110
 Ile Gly Phe Ile Ala Gly Tyr Ile Ser His Leu Val Leu Asp Phe Leu
 115 120 125
 Thr Ser Glu Gly Ile Glu Leu Phe Tyr Pro Trp Lys Thr Asn Phe Lys
 130 135 140
 Ile Ala Lys Ile Lys Thr Gly Ser Lys Thr Glu Lys Ile Ile Asn Lys
 145 150 155 160
 Ile Leu Lys Ile Phe Asn Phe Leu Leu Ile Ile Tyr Asn Ile Val Leu
 165 170 175
 Ile Leu Ser Asp Ile Leu Gly Ile Asn Ile Leu Ser Phe Ile Ser Lys
 180 185 190
 Ser Thr Leu Phe
 195

<210> 16

<211> 5628

5 <212> ADN

<213> Clostridium perfringens

<220>

<221> CDS

10 <222> (673)..(5628)

<223> Gen tpeL

<400> 16

ES 2 884 215 T3

gatcttaatg aacctaatac agatatatgt gtttatgatt taatagacaa gctttcagaa	60
aaagaaagaa aaataattaa atataaatac atacatggaa aaagtgatgt tgaaataggg	120
aaattactta attattctag acagcacgta aaccaaataa aaaatagagc attaaaaaat	180
ttgaagaaat ttttagagga gtgatttaat ctaaatatta aaattaaata tttataggag	240
gttaattgtg gattcagaac tgtttaaaat tatggctact caaggagctt ttgctttact	300
attttcctac ttgttatttt atgtattaaa agaaaatagc aaaagagaag aaaattatca	360
aaatataatt aaggagctta cagaattact accaattata aaaagtgatg ttgaagacat	420

ES 2 884 215 T3

aaaaaataaa ttgaataata attagaaaaa atttataaaa aatataaatt ttaaattttt	480
atttacaaaa tttaaaatta gaactcttta tataatgtat aagaaattta attctaagta	540
tataaaatac taaaggaggg ttaagaagaa taaaatttga aaggaaaaaa tttgtgcaaa	600
ttcaaattta taattagatt gaaggagga tttgatgtaa atataaatta agttttacat	660
caacaataat at atg ggg tta atg tca aaa gaa caa tta att ata tta gca Met Gly Leu Met Ser Lys Glu Gln Leu Ile Ile Leu Ala 1 5 10	711
aaa aat tca agt cca aaa gaa gga gaa tat aaa aaa att tta gaa tta Lys Asn Ser Ser Pro Lys Glu Gly Glu Tyr Lys Lys Ile Leu Glu Leu 15 20 25	759
cta gat gaa tat aat tta tta aat aat tct gtt gaa aaa aat agt ata Leu Asp Glu Tyr Asn Leu Leu Asn Asn Ser Val Glu Lys Asn Ser Ile 30 35 40 45	807
gat tta tat tta aaa ctt aat gaa tta tct aaa tca att gat att tat Asp Leu Tyr Leu Lys Leu Asn Glu Leu Ser Lys Ser Ile Asp Ile Tyr 50 55 60	855
tta aaa aaa tat aag aat tca aag aga aat aat gca tta tat caa tta Leu Lys Lys Tyr Lys Asn Ser Lys Arg Asn Asn Ala Leu Tyr Gln Leu 65 70 75	903
aaa tct gat tta aca aag gaa gtt att gaa ata aaa gat act aat tta Lys Ser Asp Leu Thr Lys Glu Val Ile Glu Ile Lys Asp Thr Asn Leu 80 85 90	951
aaa cct ttg gaa aaa aat att cat ttt gtt tgg gtt gga gga atg ata Lys Pro Leu Glu Lys Asn Ile His Phe Val Trp Val Gly Gly Met Ile 95 100 105	999
aat aat ata tct att gat tat ata aat caa tgg aaa gat att aat agc Asn Asn Ile Ser Ile Asp Tyr Ile Asn Gln Trp Lys Asp Ile Asn Ser 110 115 120 125	1047
gat tat gaa act att ata tgg tat gat agt gaa gct ttg tta gta aat Asp Tyr Glu Thr Ile Ile Trp Tyr Asp Ser Glu Ala Leu Leu Val Asn 130 135 140	1095
ata tta aaa aaa gct ata ata gac tca tca aat aaa gaa gtt tta act Ile Leu Lys Lys Ala Ile Ile Asp Ser Ser Asn Lys Glu Val Leu Thr 145 150 155	1143
aaa tat gaa tca gta tta aat gat aat agc ttt gat tca aat aaa ttt Lys Tyr Glu Ser Val Leu Asn Asp Asn Ser Phe Asp Ser Asn Lys Phe 160 165 170	1191
tat aga gaa aga atg gaa gtt att ttt aga aag caa aaa gag ttt aat Tyr Arg Glu Arg Met Glu Val Ile Phe Arg Lys Gln Lys Glu Phe Asn 175 180 185	1239
aat tat tat aat aca aat gat aac tat act aaa tct tta aat gat gta Asn Tyr Tyr Asn Thr Asn Asp Asn Tyr Thr Lys Ser Leu Asn Asp Val 190 195 200 205	1287
att aaa gtt tat tta ata gaa aaa tat tta aaa act gat gaa gaa tta Ile Lys Val Tyr Leu Ile Glu Lys Tyr Leu Lys Thr Asp Glu Glu Leu 210 215 220	1335

ES 2 884 215 T3

gaa aaa tat att aat gaa agt aaa gaa gtt ttt aag gct aat gga gct Glu Lys Tyr Ile Asn Glu Ser Lys Glu Val Phe Lys Ala Asn Gly Ala 225 230 235	1383
aaa gat ata aga gaa tac gat ata cta gat gat gtt gaa tta aaa tca Lys Asp Ile Arg Glu Tyr Asp Ile Leu Asp Asp Val Glu Leu Lys Ser 240 245 250	1431
ata tat gag caa gag tta tta atg aga ttt aat tta gca tct gca tca Ile Tyr Glu Gln Glu Leu Leu Met Arg Phe Asn Leu Ala Ser Ala Ser 255 260 265	1479
gat att att aga gtg att gta tta aat aaa tta ggt ggg att tat tta Asp Ile Ile Arg Val Ile Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ile Tyr Leu 270 275 280 285	1527
gat gta gat gtg ctt cct gga ata aaa aaa cat att ttt aaa gat att Asp Val Asp Val Leu Pro Gly Ile Lys Lys His Ile Phe Lys Asp Ile 290 295 300	1575
aat aaa cct aca aat att tct gaa aat aaa tgg caa atg att caa tta Asn Lys Pro Thr Asn Ile Ser Glu Asn Lys Trp Gln Met Ile Gln Leu 305 310 315	1623
gaa act att atg aaa tat aaa caa tat ata aaa gga tat aca gaa aat Glu Thr Ile Met Lys Tyr Lys Gln Tyr Ile Lys Gly Tyr Thr Glu Asn 320 325 330	1671
tca ttt aaa aat tta cca agt gat ttg cag gaa atg tta caa gaa aaa Ser Phe Lys Asn Leu Pro Ser Asp Leu Gln Glu Met Leu Gln Glu Lys 335 340 345	1719
gtt gtt gaa aaa aat ctt aaa agt gat ata ttt cag aga tta ggg gat Val Val Glu Lys Asn Leu Lys Ser Asp Ile Phe Gln Arg Leu Gly Asp 350 355 360 365	1767
ata ttt att tca gaa tta gat aca aaa ata gct ttt atg ttt ggg aaa Ile Phe Ile Ser Glu Leu Asp Thr Lys Ile Ala Phe Met Phe Gly Lys 370 375 380	1815
att gct aat caa gta tta ata tct aaa aaa aat tca tac tca tta aat Ile Ala Asn Gln Val Leu Ile Ser Lys Lys Asn Ser Tyr Ser Leu Asn 385 390 395	1863
tta ata att aat caa atc aag aat aga tat aat att att aat aaa tgt Leu Ile Ile Asn Gln Ile Lys Asn Arg Tyr Asn Ile Ile Asn Lys Cys 400 405 410	1911
tta tct tcg gct att gaa aaa gga tca aat ttt aat aat aca gtt gat Leu Ser Ser Ala Ile Glu Lys Gly Ser Asn Phe Asn Asn Thr Val Asp 415 420 425	1959
ata ttc att caa caa tta aat gaa ttc tat gtt aat gaa ggc ttt ttt Ile Phe Ile Gln Gln Leu Asn Glu Phe Tyr Val Asn Glu Gly Phe Phe 430 435 440 445	2007
gtt agt aaa gta atg gga tat tta ggt gat gga tat atg cct gat atg Val Ser Lys Val Met Gly Tyr Leu Gly Asp Gly Tyr Met Pro Asp Met 450 455 460	2055
aga gcg aca ctt aat ata agt ggt cca gga ata tat aca gct gct tat Arg Ala Thr Leu Asn Ile Ser Gly Pro Gly Ile Tyr Thr Ala Ala Tyr	2103

ES 2 884 215 T3

465	470	475	
tat gat tta tta tat ttt aat gag agg tca tta aat cct caa att tta Tyr Asp Leu Leu Tyr Phe Asn Glu Arg Ser Leu Asn Pro Gln Ile Leu 480 485 490			2151
caa gaa gat ttg aaa tat ttt gaa gtt cca caa gct cta ata tca caa Gln Glu Asp Leu Lys Tyr Phe Glu Val Pro Gln Ala Leu Ile Ser Gln 495 500 505			2199
caa aca gaa caa gaa ata aat agt tca tgg aca ttt aat caa gtt aaa Gln Thr Glu Gln Glu Ile Asn Ser Ser Trp Phe Asn Gln Val Lys 510 515 520 525			2247
tca caa ata gaa tat aaa aag cta gta gaa aaa tat act aat aaa tca Ser Gln Ile Glu Tyr Lys Lys Leu Val Glu Lys Tyr Thr Asn Lys Ser 530 535 540			2295
tta agt gaa aat gat aaa cta aat ttt aat gag aat aaa atc att gat Leu Ser Glu Asn Asp Lys Leu Asn Phe Asn Glu Asn Lys Ile Ile Asp 545 550 555			2343
aaa gta gaa tta cta aat cga att aat agt aat aat tta att aat ttt Lys Val Glu Leu Leu Asn Arg Ile Asn Ser Asn Asn Leu Ile Asn Phe 560 565 570			2391
gat gat aaa gaa tac tta aga tat ata att caa tta caa ggt gat aaa Asp Asp Lys Glu Tyr Leu Arg Tyr Ile Ile Gln Leu Gln Gly Asp Lys 575 580 585			2439
gta agt tat gag gct gca ata aat tta ttt att aaa aat cct tca aat Val Ser Tyr Glu Ala Ile Asn Leu Phe Ile Lys Asn Pro Ser Asn 590 595 600 605			2487
tca ata cta gtt caa gaa att aat aat ata agc tac tat ttt aat tca Ser Ile Leu Val Gln Glu Ile Asn Asn Ile Ser Tyr Tyr Phe Asn Ser 610 615 620			2535
gaa tat aaa tca ata gat tct ata caa ttt gat aat att cct gaa ata Glu Tyr Lys Ser Ile Asp Ser Ile Gln Phe Asp Asn Ile Pro Glu Ile 625 630 635			2583
tta aaa ggt aaa aat aaa att aaa tta aca ttt ata ggt cat gga gaa Leu Lys Gly Lys Asn Lys Ile Lys Leu Thr Phe Ile Gly His Gly Glu 640 645 650			2631
gaa gaa ttt aat aca gag aga ttt gct tca tta aca gta aag gag ttt Glu Glu Phe Asn Thr Glu Arg Phe Ala Ser Leu Thr Val Lys Glu Phe 655 660 665			2679
tca aaa aaa ata tat aaa gtt tta gat atg ata aag agc aat acg aat Ser Lys Lys Ile Tyr Lys Val Leu Asp Met Ile Lys Ser Asn Thr Asn 670 675 680 685			2727
gtt aaa gaa att caa ata gat ttg tta gga tgt aat atg ttt tca tat Val Lys Glu Ile Gln Ile Asp Leu Leu Gly Cys Asn Met Phe Ser Tyr 690 695 700			2775
aat ata aat gta gaa gaa aca tat cct ggg aaa tta tta aaa gta gta Asn Ile Asn Val Glu Glu Thr Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Lys Val Val 705 710 715			2823
tta gat tat gta gat aaa att tat aat gca gat att aaa cca gaa ata			2871

ES 2 884 215 T3

Leu	Asp	Tyr	Val	Asp	Lys	Ile	Tyr	Asn	Ala	Asp	Ile	Lys	Pro	Glu	Ile	
	720						725					730				
aaa	ata	agt	gcc	aat	caa	tat	gaa	gtc	aga	ata	aat	aaa	gat	ggg	aaa	2919
Lys	Ile	Ser	Ala	Asn	Gln	Tyr	Glu	Val	Arg	Ile	Asn	Lys	Asp	Gly	Lys	
	735					740					745					
aaa	gaa	tta	cta	tct	cat	tca	gga	gag	tgg	ctt	tct	aaa	gaa	gaa	gct	2967
Lys	Glu	Leu	Leu	Ser	His	Ser	Gly	Glu	Trp	Leu	Ser	Lys	Glu	Glu	Ala	
	750				755					760					765	
ata	ata	aaa	gat	att	gcg	agt	aaa	gaa	att	att	tat	ttt	gat	aca	aga	3015
Ile	Ile	Lys	Asp	Ile	Ala	Ser	Lys	Glu	Ile	Ile	Tyr	Phe	Asp	Thr	Arg	
				770					775					780		
gaa	aat	act	att	aaa	gca	gaa	gct	aaa	aat	att	atg	gag	ttg	ata	act	3063
Glu	Asn	Thr	Ile	Lys	Ala	Glu	Ala	Lys	Asn	Ile	Met	Glu	Leu	Ile	Thr	
			785					790					795			
ttt	aga	aat	agt	cta	gat	aaa	aaa	tta	aat	gat	tta	gaa	agt	tta	att	3111
Phe	Arg	Asn	Ser	Leu	Asp	Lys	Lys	Leu	Asn	Asp	Leu	Glu	Ser	Leu	Ile	
	800					805						810				
aat	aat	aat	ttt	att	gta	aat	gaa	gta	tat	gaa	caa	tta	aca	tca	aat	3159
Asn	Asn	Asn	Phe	Ile	Val	Asn	Glu	Val	Tyr	Glu	Gln	Leu	Thr	Ser	Asn	
	815					820					825					
aat	tta	tat	aga	aca	agt	ttt	aga	aat	tct	ttt	tta	gat	act	ata	aat	3207
Asn	Leu	Tyr	Arg	Thr	Ser	Phe	Arg	Asn	Ser	Phe	Leu	Asp	Thr	Ile	Asn	
	830				835				840						845	
ttt	ata	gaa	gat	gtt	tct	caa	gag	tta	tat	gaa	ata	aag	ata	aaa	aat	3255
Phe	Ile	Glu	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Leu	Tyr	Glu	Ile	Lys	Ile	Lys	Asn	
				850					855					860		
aat	ata	aac	gat	gat	tat	atc	atg	gca	tta	gat	gaa	ata	aag	caa	gat	3303
Asn	Ile	Asn	Asp	Asp	Tyr	Ile	Met	Ala	Leu	Asp	Glu	Ile	Lys	Gln	Asp	
			865					870					875			
aat	aat	att	tca	gaa	att	aaa	ttt	att	aat	att	aat	tca	gga	gaa	ttt	3351
Asn	Asn	Ile	Ser	Glu	Ile	Lys	Phe	Ile	Asn	Ile	Asn	Ser	Gly	Glu	Phe	
		880				885						890				
agg	gtt	gta	aga	gaa	aat	agt	agg	tta	att	aat	aaa	ttt	aaa	gaa	gat	3399
Arg	Val	Val	Arg	Glu	Asn	Ser	Arg	Leu	Ile	Asn	Lys	Phe	Lys	Glu	Asp	
	895					900					905					
ttt	aaa	ttt	atg	att	aat	aat	att	aag	agg	ttg	ata	aaa	ttt	agt	gat	3447
Phe	Lys	Phe	Met	Ile	Asn	Asn	Ile	Lys	Arg	Leu	Ile	Lys	Phe	Ser	Asp	
	910				915					920					925	
aat	aac	aag	cta	ata	aca	tca	ttt	gaa	tta	aag	aat	ata	gag	tca	agc	3495
Asn	Asn	Lys	Leu	Ile	Thr	Ser	Phe	Glu	Leu	Lys	Asn	Ile	Glu	Ser	Ser	
			930						935					940		
agt	gga	gta	agt	aca	tta	aat	aca	agt	ttt	tta	att	caa	tct	atg	att	3543
Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Leu	Asn	Thr	Ser	Phe	Leu	Ile	Gln	Ser	Met	Ile	
			945					950					955			
gat	tat	aaa	gcg	caa	aac	ttt	gac	ttc	aat	aaa	tta	agt	aca	tca	gta	3591
Asp	Tyr	Lys	Ala	Gln	Asn	Phe	Asp	Phe	Asn	Lys	Leu	Ser	Thr	Ser	Val	
		960					965					970				

ES 2 884 215 T3

aaa gta cag att tat tgt caa ata act aat ata agt tta tca gaa att Lys Val Gln Ile Tyr Cys Gln Ile Thr Asn Ile Ser Leu Ser Glu Ile 975 980 985	3639
caa gat gct agt aat tta gta aaa att ata gct gaa gca aat gaa att Gln Asp Ala Ser Asn Leu Val Lys Ile Ile Ala Glu Ala Asn Glu Ile 990 995 1000 1005	3687
gaa ata aat tta ata cca aca tta gca aat gct ata cca tta ata Glu Ile Asn Leu Ile Pro Thr Leu Ala Asn Ala Ile Pro Leu Ile 1010 1015 1020	3732
aca aca ata gtt gat gga ata aat ttg att gca aat ata gat gaa Thr Thr Ile Val Asp Gly Ile Asn Leu Ile Ala Asn Ile Asp Glu 1025 1030 1035	3777
tta ata aat act aaa gat gaa tta cta aga aag gaa tta gca gct Leu Ile Asn Thr Lys Asp Glu Leu Leu Arg Lys Glu Leu Ala Ala 1040 1045 1050	3822
aga att gga att att tca tct aat atg aca gca gct att agt tct Arg Ile Gly Ile Ile Ser Ser Asn Met Thr Ala Ala Ile Ser Ser 1055 1060 1065	3867
tat att tta tat ttt act gaa ttt gga gaa gta ttt aat cct tta Tyr Ile Leu Tyr Phe Thr Glu Phe Gly Glu Val Phe Asn Pro Leu 1070 1075 1080	3912
tta gtg cca att gca ggt ata tca agt ggt att cct act tta gta Leu Val Pro Ile Ala Gly Ile Ser Ser Gly Ile Pro Thr Leu Val 1085 1090 1095	3957
aat aat att tta att tta gag gaa aaa tct aaa gaa ata aca gaa Asn Asn Ile Leu Ile Leu Glu Glu Lys Ser Lys Glu Ile Thr Glu 1100 1105 1110	4002
tat ttt tca cat ata agt aaa gta gaa agt gat gga tta ttt aaa Tyr Phe Ser His Ile Ser Lys Val Glu Ser Asp Gly Leu Phe Lys 1115 1120 1125	4047
gtg tct gat aat aac agt ata ttg att cca ctt gat gat att gca Val Ser Asp Asn Asn Ser Ile Leu Ile Pro Leu Asp Asp Ile Ala 1130 1135 1140	4092
att tct aag att gat ttt aat aaa aga gaa gtt atc tta gat aaa Ile Ser Lys Ile Asp Phe Asn Lys Arg Glu Val Ile Leu Asp Lys 1145 1150 1155	4137
tta gat ata tgg gca atg gaa gga gga tca gga tta agt ggt aaa Leu Asp Ile Trp Ala Met Glu Gly Gly Ser Gly Leu Ser Gly Lys 1160 1165 1170	4182
gaa act ttt ttt tct gct ccg tat ata aat gaa aat ctt cct aaa Glu Thr Phe Phe Ser Ala Pro Tyr Ile Asn Glu Asn Leu Pro Lys 1175 1180 1185	4227
tta tct att gat aat ttg ctt aag ata gat ata aat aaa ata gat Leu Ser Ile Asp Asn Leu Leu Lys Ile Asp Ile Asn Lys Ile Asp 1190 1195 1200	4272
ttt tca att aaa ggt atg atg cta cct aat ggc gtt agt aaa aca Phe Ser Ile Lys Gly Met Met Leu Pro Asn Gly Val Ser Lys Thr 1205 1210 1215	4317

ES 2 884 215 T3

tta ggt tat gag ttc aat aca gtt gcc aat ata tat gaa tta gaa Leu Gly Tyr Glu Phe Asn Thr Val Ala Asn Ile Tyr Glu Leu Glu 1220 1225 1230	4362
aat gat ggt gta aat tta tta aat aga att aga gat aat tat cca Asn Asp Gly Val Asn Leu Leu Asn Arg Ile Arg Asp Asn Tyr Pro 1235 1240 1245	4407
gga cag ttt tat tgg aga tat tat gct act cta ttt aat tat ggt Gly Gln Phe Tyr Trp Arg Tyr Tyr Ala Thr Leu Phe Asn Tyr Gly 1250 1255 1260	4452
atg gta aat tta aaa att aat tat cat gac aca gat gta aaa ata Met Val Asn Leu Lys Ile Asn Tyr His Asp Thr Asp Val Lys Ile 1265 1270 1275	4497
aat tta gat aat gtt gat cgt atg ttt ata gta ccg aca tta aca Asn Leu Asp Asn Val Asp Arg Met Phe Ile Val Pro Thr Leu Thr 1280 1285 1290	4542
ata gat caa gct aga gaa aaa ctt tca tat aat ttt aat gga gca Ile Asp Gln Ala Arg Glu Lys Leu Ser Tyr Asn Phe Asn Gly Ala 1295 1300 1305	4587
gga gct aat tat tat ata tac ctt tcg tct caa cca ata aaa ata Gly Ala Asn Tyr Tyr Ile Tyr Leu Ser Ser Gln Pro Ile Lys Ile 1310 1315 1320	4632
ttt att aat ggg act aaa gaa gat aat tgg att ctt aat ata gat Phe Ile Asn Gly Thr Lys Glu Asp Asn Trp Ile Leu Asn Ile Asp 1325 1330 1335	4677
gat att gtt aaa gaa gtt aca att gtt aat aat agt ata gta aga Asp Ile Val Lys Glu Val Thr Ile Val Asn Asn Ser Ile Val Arg 1340 1345 1350	4722
gga aag ttt att gaa aat ata ttt aaa aaa tta act att gag gat Gly Lys Phe Ile Glu Asn Ile Phe Lys Lys Leu Thr Ile Glu Asp 1355 1360 1365	4767
aat aaa ata att ata gga aat caa aaa ata tat tta aaa aat aac Asn Lys Ile Ile Ile Gly Asn Gln Lys Ile Tyr Leu Lys Asn Asn 1370 1375 1380	4812
aaa aca aat ata cat ttt tct gta tct att tta gat gga gtg aat Lys Thr Asn Ile His Phe Ser Val Ser Ile Leu Asp Gly Val Asn 1385 1390 1395	4857
tta atg gta gaa gta gac ttt aat aat aaa atg tat cat tta tca Leu Met Val Glu Val Asp Phe Asn Asn Lys Met Tyr His Leu Ser 1400 1405 1410	4902
ctt caa gga aac gaa aaa aca ata tgt aat aat atg aat att ata Leu Gln Gly Asn Glu Lys Thr Ile Cys Asn Asn Met Asn Ile Ile 1415 1420 1425	4947
caa aat aac ata aat aaa tta ttt ggc tct tca aat ata aaa tca Gln Asn Asn Ile Asn Lys Leu Phe Gly Ser Ser Asn Ile Lys Ser 1430 1435 1440	4992
ata cca tat ttc tat aaa aat aat gga tta gag aat tgt att gga Ile Pro Tyr Phe Tyr Lys Asn Asn Gly Leu Glu Asn Cys Ile Gly	5037

ES 2 884 215 T3

	1445	1450	1455	
gta ttc tca ata aaa aac aat gaa ttt att tat atg tta aaa tat				5082
Val Phe Ser Ile Lys Asn Asn Glu Phe Ile Tyr Met Leu Lys Tyr	1460	1465	1470	
gat gat aaa aat aaa ata tat aaa tat aaa gat aat aat tta gta				5127
Asp Asp Lys Asn Lys Ile Tyr Lys Tyr Lys Asp Asn Asn Leu Val	1475	1480	1485	
tgt ggt ttt aat tta ttt gat ata tct tat gta gat ata att tct				5172
Cys Gly Phe Asn Leu Phe Asp Ile Ser Tyr Val Asp Ile Ile Ser	1490	1495	1500	
aat gga gat aag aat tat ttg aaa gga att tgg aat aca tca gtt				5217
Asn Gly Asp Lys Asn Tyr Leu Lys Gly Ile Trp Asn Thr Ser Val	1505	1510	1515	
aat aat tca gaa tat aaa att gaa ttt tta gtt gaa tta ata gac				5262
Asn Asn Ser Glu Tyr Lys Ile Glu Phe Leu Val Glu Leu Ile Asp	1520	1525	1530	
caa aat act att gaa atc att aaa ttg aat tta agt gat gga tta				5307
Gln Asn Thr Ile Glu Ile Ile Lys Leu Asn Leu Ser Asp Gly Leu	1535	1540	1545	
ata aaa tca ttt tta act ata tta gat aat tta gaa agt tta gat				5352
Ile Lys Ser Phe Leu Thr Ile Leu Asp Asn Leu Glu Ser Leu Asp	1550	1555	1560	
gta aaa att tca aca ata tat gat ttt tta aaa aat att ctt ttt				5397
Val Lys Ile Ser Thr Ile Tyr Asp Phe Leu Lys Asn Ile Leu Phe	1565	1570	1575	
agg gat gta ttt tta gaa aat gag tca tta aat ttt att gta agt				5442
Arg Asp Val Phe Leu Glu Asn Glu Ser Leu Asn Phe Ile Val Ser	1580	1585	1590	
aaa ggc ttt gtt ttg aca ggg aat aat tca aaa aat aaa tac gag				5487
Lys Gly Phe Val Leu Thr Gly Asn Asn Ser Lys Asn Lys Tyr Glu	1595	1600	1605	
ttt ata tgt aat agt gaa aat ata caa tta tat att act gaa ctt				5532
Phe Ile Cys Asn Ser Glu Asn Ile Gln Leu Tyr Ile Thr Glu Leu	1610	1615	1620	
tac act aat ggt act aaa ttt agg aat tgg ctt gac aat ggt aag				5577
Tyr Thr Asn Gly Thr Lys Phe Arg Asn Trp Leu Asp Asn Gly Lys	1625	1630	1635	
ata tta gta tca tca aca ggt gaa agt tca aat aat tta att gac				5622
Ile Leu Val Ser Ser Thr Gly Glu Ser Ser Asn Asn Leu Ile Asp	1640	1645	1650	
ata taa				5628
Ile				

<210> 17

<211> 1651

5

<212> PRT

<213> Clostridium perfringens

<400> 17

ES 2 884 215 T3

Met	Gly	Leu	Met	Ser	Lys	Glu	Gln	Leu	Ile	Ile	Leu	Ala	Lys	Asn	Ser	1	5	10	15
Ser	Pro	Lys	Glu	Gly	Glu	Tyr	Lys	Lys	Ile	Leu	Glu	Leu	Leu	Asp	Glu	20	25	30	
Tyr	Asn	Leu	Leu	Asn	Asn	Ser	Val	Glu	Lys	Asn	Ser	Ile	Asp	Leu	Tyr	35	40	45	
Leu	Lys	Leu	Asn	Glu	Leu	Ser	Lys	Ser	Ile	Asp	Ile	Tyr	Leu	Lys	Lys	50	55	60	
Tyr	Lys	Asn	Ser	Lys	Arg	Asn	Asn	Ala	Leu	Tyr	Gln	Leu	Lys	Ser	Asp	65	70	75	80
Leu	Thr	Lys	Glu	Val	Ile	Glu	Ile	Lys	Asp	Thr	Asn	Leu	Lys	Pro	Leu	85	90	95	
Glu	Lys	Asn	Ile	His	Phe	Val	Trp	Val	Gly	Gly	Met	Ile	Asn	Asn	Ile	100	105	110	
Ser	Ile	Asp	Tyr	Ile	Asn	Gln	Trp	Lys	Asp	Ile	Asn	Ser	Asp	Tyr	Glu	115	120	125	
Thr	Ile	Ile	Trp	Tyr	Asp	Ser	Glu	Ala	Leu	Leu	Val	Asn	Ile	Leu	Lys	130	135	140	
Lys	Ala	Ile	Ile	Asp	Ser	Ser	Asn	Lys	Glu	Val	Leu	Thr	Lys	Tyr	Glu	145	150	155	160
Ser	Val	Leu	Asn	Asp	Asn	Ser	Phe	Asp	Ser	Asn	Lys	Phe	Tyr	Arg	Glu	165	170	175	
Arg	Met	Glu	Val	Ile	Phe	Arg	Lys	Gln	Lys	Glu	Phe	Asn	Asn	Tyr	Tyr	180	185	190	
Asn	Thr	Asn	Asp	Asn	Tyr	Thr	Lys	Ser	Leu	Asn	Asp	Val	Ile	Lys	Val	195	200	205	
Tyr	Leu	Ile	Glu	Lys	Tyr	Leu	Lys	Thr	Asp	Glu	Glu	Leu	Glu	Lys	Tyr	210	215	220	
Ile	Asn	Glu	Ser	Lys	Glu	Val	Phe	Lys	Ala	Asn	Gly	Ala	Lys	Asp	Ile	225	230	235	240

ES 2 884 215 T3

Arg Glu Tyr Asp Ile Leu Asp Asp Val Glu Leu Lys Ser Ile Tyr Glu
 245 250 255
 Gln Glu Leu Leu Met Arg Phe Asn Leu Ala Ser Ala Ser Asp Ile Ile
 260 265 270
 Arg Val Ile Val Leu Asn Lys Leu Gly Gly Ile Tyr Leu Asp Val Asp
 275 280 285
 Val Leu Pro Gly Ile Lys Lys His Ile Phe Lys Asp Ile Asn Lys Pro
 290 295 300
 Thr Asn Ile Ser Glu Asn Lys Trp Gln Met Ile Gln Leu Glu Thr Ile
 305 310 315 320
 Met Lys Tyr Lys Gln Tyr Ile Lys Gly Tyr Thr Glu Asn Ser Phe Lys
 325 330 335
 Asn Leu Pro Ser Asp Leu Gln Glu Met Leu Gln Glu Lys Val Val Glu
 340 345 350
 Lys Asn Leu Lys Ser Asp Ile Phe Gln Arg Leu Gly Asp Ile Phe Ile
 355 360 365
 Ser Glu Leu Asp Thr Lys Ile Ala Phe Met Phe Gly Lys Ile Ala Asn
 370 375 380
 Gln Val Leu Ile Ser Lys Lys Asn Ser Tyr Ser Leu Asn Leu Ile Ile
 385 390 395 400
 Asn Gln Ile Lys Asn Arg Tyr Asn Ile Ile Asn Lys Cys Leu Ser Ser
 405 410 415
 Ala Ile Glu Lys Gly Ser Asn Phe Asn Asn Thr Val Asp Ile Phe Ile
 420 425 430
 Gln Gln Leu Asn Glu Phe Tyr Val Asn Glu Gly Phe Phe Val Ser Lys
 435 440 445
 Val Met Gly Tyr Leu Gly Asp Gly Tyr Met Pro Asp Met Arg Ala Thr
 450 455 460
 Leu Asn Ile Ser Gly Pro Gly Ile Tyr Thr Ala Ala Tyr Tyr Asp Leu
 465 470 475 480
 Leu Tyr Phe Asn Glu Arg Ser Leu Asn Pro Gln Ile Leu Gln Glu Asp
 485 490 495

ES 2 884 215 T3

Leu Lys Tyr Phe Glu Val Pro Gln Ala Leu Ile Ser Gln Gln Thr Glu
 500 505 510

Gln Glu Ile Asn Ser Ser Trp Thr Phe Asn Gln Val Lys Ser Gln Ile
 515 520 525

Glu Tyr Lys Lys Leu Val Glu Lys Tyr Thr Asn Lys Ser Leu Ser Glu
 530 535 540

Asn Asp Lys Leu Asn Phe Asn Glu Asn Lys Ile Ile Asp Lys Val Glu
 545 550 555 560

Leu Leu Asn Arg Ile Asn Ser Asn Asn Leu Ile Asn Phe Asp Asp Lys
 565 570 575

Glu Tyr Leu Arg Tyr Ile Ile Gln Leu Gln Gly Asp Lys Val Ser Tyr
 580 585 590

Glu Ala Ala Ile Asn Leu Phe Ile Lys Asn Pro Ser Asn Ser Ile Leu
 595 600 605

Val Gln Glu Ile Asn Asn Ile Ser Tyr Tyr Phe Asn Ser Glu Tyr Lys
 610 615 620

Ser Ile Asp Ser Ile Gln Phe Asp Asn Ile Pro Glu Ile Leu Lys Gly
 625 630 635 640

Lys Asn Lys Ile Lys Leu Thr Phe Ile Gly His Gly Glu Glu Glu Phe
 645 650 655

Asn Thr Glu Arg Phe Ala Ser Leu Thr Val Lys Glu Phe Ser Lys Lys
 660 665 670

Ile Tyr Lys Val Leu Asp Met Ile Lys Ser Asn Thr Asn Val Lys Glu
 675 680 685

Ile Gln Ile Asp Leu Leu Gly Cys Asn Met Phe Ser Tyr Asn Ile Asn
 690 695 700

Val Glu Glu Thr Tyr Pro Gly Lys Leu Leu Lys Val Val Leu Asp Tyr
 705 710 715 720

Val Asp Lys Ile Tyr Asn Ala Asp Ile Lys Pro Glu Ile Lys Ile Ser
 725 730 735

Ala Asn Gln Tyr Glu Val Arg Ile Asn Lys Asp Gly Lys Lys Glu Leu
 740 745 750

ES 2 884 215 T3

Leu Ser His Ser Gly Glu Trp Leu Ser Lys Glu Glu Ala Ile Ile Lys
 755 760 765
 Asp Ile Ala Ser Lys Glu Ile Ile Tyr Phe Asp Thr Arg Glu Asn Thr
 770 775 780
 Ile Lys Ala Glu Ala Lys Asn Ile Met Glu Leu Ile Thr Phe Arg Asn
 785 790 795 800
 Ser Leu Asp Lys Lys Leu Asn Asp Leu Glu Ser Leu Ile Asn Asn Asn
 805 810 815
 Phe Ile Val Asn Glu Val Tyr Glu Gln Leu Thr Ser Asn Asn Leu Tyr
 820 825 830
 Arg Thr Ser Phe Arg Asn Ser Phe Leu Asp Thr Ile Asn Phe Ile Glu
 835 840 845
 Asp Val Ser Gln Glu Leu Tyr Glu Ile Lys Ile Lys Asn Asn Ile Asn
 850 855 860
 Asp Asp Tyr Ile Met Ala Leu Asp Glu Ile Lys Gln Asp Asn Asn Ile
 865 870 875 880
 Ser Glu Ile Lys Phe Ile Asn Ile Asn Ser Gly Glu Phe Arg Val Val
 885 890 895
 Arg Glu Asn Ser Arg Leu Ile Asn Lys Phe Lys Glu Asp Phe Lys Phe
 900 905 910
 Met Ile Asn Asn Ile Lys Arg Leu Ile Lys Phe Ser Asp Asn Asn Lys
 915 920 925
 Leu Ile Thr Ser Phe Glu Leu Lys Asn Ile Glu Ser Ser Ser Gly Val
 930 935 940
 Ser Thr Leu Asn Thr Ser Phe Leu Ile Gln Ser Met Ile Asp Tyr Lys
 945 950 955 960
 Ala Gln Asn Phe Asp Phe Asn Lys Leu Ser Thr Ser Val Lys Val Gln
 965 970 975
 Ile Tyr Cys Gln Ile Thr Asn Ile Ser Leu Ser Glu Ile Gln Asp Ala
 980 985 990
 Ser Asn Leu Val Lys Ile Ile Ala Glu Ala Asn Glu Ile Glu Ile Asn

ES 2 884 215 T3

995					1000					1005				
Leu Ile	Pro Thr	Leu Ala	Asn	Ala Ile	Pro Leu	Ile Thr	Thr Ile							
1010			1015			1020								
Val Asp	Gly Ile	Asn Leu	Ile	Ala Asn	Ile Asp	Glu Leu	Ile Asn							
1025			1030			1035								
Thr Lys	Asp Glu	Leu Leu	Arg	Lys Glu	Leu Ala	Ala Arg	Ile Gly							
1040			1045			1050								
Ile Ile	Ser Ser	Asn Met	Thr	Ala Ala	Ile Ser	Ser Tyr	Ile Leu							
1055			1060			1065								
Tyr Phe	Thr Glu	Phe Gly	Glu	Val Phe	Asn Pro	Leu Leu	Val Pro							
1070			1075			1080								
Ile Ala	Gly Ile	Ser Ser	Gly	Ile Pro	Thr Leu	Val Asn	Asn Ile							
1085			1090			1095								
Leu Ile	Leu Glu	Glu Lys	Ser	Lys Glu	Ile Thr	Glu Tyr	Phe Ser							
1100			1105			1110								
His Ile	Ser Lys	Val Glu	Ser	Asp Gly	Leu Phe	Lys Val	Ser Asp							
1115			1120			1125								
Asn Asn	Ser Ile	Leu Ile	Pro	Leu Asp	Asp Ile	Ala Ile	Ser Lys							
1130			1135			1140								
Ile Asp	Phe Asn	Lys Arg	Glu	Val Ile	Leu Asp	Lys Leu	Asp Ile							
1145			1150			1155								
Trp Ala	Met Glu	Gly Gly	Ser	Gly Leu	Ser Gly	Lys Glu	Thr Phe							
1160			1165			1170								
Phe Ser	Ala Pro	Tyr Ile	Asn	Glu Asn	Leu Pro	Lys Leu	Ser Ile							
1175			1180			1185								
Asp Asn	Leu Leu	Lys Ile	Asp	Ile Asn	Lys Ile	Asp Phe	Ser Ile							
1190			1195			1200								
Lys Gly	Met Met	Leu Pro	Asn	Gly Val	Ser Lys	Thr Leu	Gly Tyr							
1205			1210			1215								
Glu Phe	Asn Thr	Val Ala	Asn	Ile Tyr	Glu Leu	Glu Asn	Asp Gly							
1220			1225			1230								

ES 2 884 215 T3

Val	Asn	Leu	Leu	Asn	Arg	Ile	Arg	Asp	Asn	Tyr	Pro	Gly	Gln	Phe
1235						1240					1245			
Tyr	Trp	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Thr	Leu	Phe	Asn	Tyr	Gly	Met	Val	Asn
1250						1255					1260			
Leu	Lys	Ile	Asn	Tyr	His	Asp	Thr	Asp	Val	Lys	Ile	Asn	Leu	Asp
1265						1270					1275			
Asn	Val	Asp	Arg	Met	Phe	Ile	Val	Pro	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp	Gln
1280						1285					1290			
Ala	Arg	Glu	Lys	Leu	Ser	Tyr	Asn	Phe	Asn	Gly	Ala	Gly	Ala	Asn
1295						1300					1305			
Tyr	Tyr	Ile	Tyr	Leu	Ser	Ser	Gln	Pro	Ile	Lys	Ile	Phe	Ile	Asn
1310						1315					1320			
Gly	Thr	Lys	Glu	Asp	Asn	Trp	Ile	Leu	Asn	Ile	Asp	Asp	Ile	Val
1325						1330					1335			
Lys	Glu	Val	Thr	Ile	Val	Asn	Asn	Ser	Ile	Val	Arg	Gly	Lys	Phe
1340						1345					1350			
Ile	Glu	Asn	Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	Thr	Ile	Glu	Asp	Asn	Lys	Ile
1355						1360					1365			
Ile	Ile	Gly	Asn	Gln	Lys	Ile	Tyr	Leu	Lys	Asn	Asn	Lys	Thr	Asn
1370						1375					1380			
Ile	His	Phe	Ser	Val	Ser	Ile	Leu	Asp	Gly	Val	Asn	Leu	Met	Val
1385						1390					1395			
Glu	Val	Asp	Phe	Asn	Asn	Lys	Met	Tyr	His	Leu	Ser	Leu	Gln	Gly
1400						1405					1410			
Asn	Glu	Lys	Thr	Ile	Cys	Asn	Asn	Met	Asn	Ile	Ile	Gln	Asn	Asn
1415						1420					1425			
Ile	Asn	Lys	Leu	Phe	Gly	Ser	Ser	Asn	Ile	Lys	Ser	Ile	Pro	Tyr
1430						1435					1440			
Phe	Tyr	Lys	Asn	Asn	Gly	Leu	Glu	Asn	Cys	Ile	Gly	Val	Phe	Ser
1445						1450					1455			
Ile	Lys	Asn	Asn	Glu	Phe	Ile	Tyr	Met	Leu	Lys	Tyr	Asp	Asp	Lys
1460						1465					1470			

ES 2 884 215 T3

Asn Lys 1475	Ile Tyr Lys Tyr Lys 1480	Asp Asn Asn Leu Val 1485	Cys Gly Phe
Asn Leu 1490	Phe Asp Ile Ser Tyr 1495	Val Asp Ile Ile Ser 1500	Asn Gly Asp
Lys Asn 1505	Tyr Leu Lys Gly Ile 1510	Trp Asn Thr Ser Val 1515	Asn Asn Ser
Glu Tyr 1520	Lys Ile Glu Phe Leu 1525	Val Glu Leu Ile Asp 1530	Gln Asn Thr
Ile Glu 1535	Ile Ile Lys Leu Asn 1540	Leu Ser Asp Gly Leu 1545	Ile Lys Ser
Phe Leu 1550	Thr Ile Leu Asp Asn 1555	Leu Glu Ser Leu Asp 1560	Val Lys Ile
Ser Thr 1565	Ile Tyr Asp Phe Leu 1570	Lys Asn Ile Leu Phe 1575	Arg Asp Val
Phe Leu 1580	Glu Asn Glu Ser Leu 1585	Asn Phe Ile Val Ser 1590	Lys Gly Phe
Val Leu 1595	Thr Gly Asn Asn Ser 1600	Lys Asn Lys Tyr Glu 1605	Phe Ile Cys
Asn Ser 1610	Glu Asn Ile Gln Leu 1615	Tyr Ile Thr Glu Leu 1620	Tyr Thr Asn
Gly Thr 1625	Lys Phe Arg Asn Trp 1630	Leu Asp Asn Gly Lys 1635	Ile Leu Val
Ser Ser 1640	Thr Gly Glu Ser Ser 1645	Asn Asn Leu Ile Asp 1650	Ile

REIVINDICACIONES

1. Un método de detección de enteritis necrótica aviar subclínica, comprendiendo el método determinar el nivel de al menos un marcador indicativo de enteritis necrótica en excrementos fecales aviares, en donde un aumento del nivel de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de enteritis necrótica y en donde el marcador se selecciona de
 - a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que consiste en al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 1,
 - 10 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que consiste en al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 3,
 - 15 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que consiste en al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 4;
 - 20 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que consiste en al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 5;
 - 25 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que consiste en al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 7;
 - 30 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que consiste en al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 8;
 - 35 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80 %, preferentemente al menos 85, 90 o 95 %, lo más preferentemente 100 %, con un polinucleótido que consiste en al menos 20, preferentemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en SEQ ID NO: 9;
 - h) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (a) a (g);
 - i) polinucleótidos (ADN y ARN) que son complementarios a las secuencias según (h);
 - j) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos según (a) a (i).
2. El método según la reivindicación 1, en donde el nivel del al menos un marcador indicativo de enteritis necrótica se determina en microvesículas aisladas de excrementos fecales aviares.
3. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la muestra aviar es una muestra de ave de corral, preferentemente una muestra de pollos, pavos, patos, gansos, pavos reales, faisanes, perdices, gallinas de Guinea, codornices, urogallos, gallos lira, palomas, cisnes, avestruces y loros, lo más preferentemente pollos.
4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se usan combinaciones de al menos 2, 3, 4, 5, 6 o 7 de dichos polinucleótidos para detectar enteritis necrótica.