

VACUNAS CONTRA EL REOVIRUS AVIAR**DATOS DE LA SOLICITUD DE CONTINUACIÓN**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los EE.UU. No. de Serie 61/932,995, presentada el 29 de enero de 2014, la cual se incorpora a la presente a modo de referencia.

ANTECEDENTES

Los reovirus aviaries se asocian con diversas enfermedades en aves de corral, las cuales incluyen síndrome de malabsorción y síndrome de tránsito rápido (STR), aunque su papel como patógenos primarios en estos síndromes clínicos no es claro. Por el contrario, la asociación de reovirus aviaries con casos clínicos de artritis viral/tenosinovitis es bastante clara, ya que los reovirus se han aislado de los tendones de aves afectadas. El control de la artritis viral/tenosinovitis inducida por reovirus puede lograrse mediante la vacunación de aves reproductoras de engorde con una combinación de vacunas vivas y/o inactivadas con inmunidad maternal pasada a la progenie para protección temprana contra el desafío de campo. En aves de engorde, las vacunas atenuadas vivas están disponibles para su uso el día de la eclosión y para su uso *in ovo*. Durante décadas se han utilizado cepas de vacunas comerciales actuales (S1133, 1733, 2408 y 2177, por nombrar algunas) para controlar enfermedades asociadas con reovirus. Sin embargo, estas cepas de vacunas comerciales fueron aisladas en los años 1960-1970 y no proporcionan protección contra aislados de reovirus actualmente en circulación de casos confirmados de artritis

viral/tenosinovitis. Por lo tanto, existe una necesidad de asilamiento y caracterización de reovirus aviares actualmente en circulación y de desarrollo de vacunas efectivas.

5 **COMPENDIO DE LA INVENCION**

La presente invención incluye reovirus aviares del grupo 1 y del grupo 2 genética y serológicamente diferentes aislados a partir de casos clínicos de artritis viral (AV)/tenosinovitis en pollos.

10 La presente invención incluye un reovirus aviar del grupo 1 aislado, en donde un reovirus aviar del grupo 1 incluye una proteína sigma C que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2 y/o SEQ ID NO:4. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 incluye una proteína sigma C que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 incluye una proteína sigma C que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 incluye una proteína sigma C que tiene una secuencia de

aminoácidos SEQ ID NO:2. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 incluye una proteína sigma C que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:4. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 se atenúa, inactiva o mata. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 se atenúa mediante al menos 25 pases en un huevo o una línea celular huésped.

La presente invención incluye un reovirus aviar del grupo 1 aislado, en donde un reovirus aviar del grupo 1 incluye un gen S1 que tiene una secuencia de nucleótidos con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1 y/o SEQ ID NO:3. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 incluye un gen S1 que tiene una secuencia de nucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos con al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 incluye un gen S1 que tiene una secuencia de nucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos con al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 incluye un gen S1 que tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1. En algunos

aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 incluye un gen S1 que tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:3. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 incluye una proteína sigma C que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 se atenúa, inactiva o mata. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 se atenúa mediante al menos 25 pases en un huevo o una línea celular huésped.

La presente invención incluye un reovirus aviar del grupo 2 aislado, en donde un reovirus aviar del grupo 2 incluye una proteína sigma C que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 2 incluye una proteína sigma C que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:6. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 2 incluye una proteína sigma C que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO:6. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 2 se atenúa, inactiva o mata. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 2 se atenúa

mediante al menos 25 pases en un huevo o una línea celular huésped.

La presente invención incluye un reovirus aviar del grupo 1 aislado, en donde un reovirus aviar del grupo 1 incluye un gen S1 que comprende una secuencia de nucleótidos con al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 2 incluye un gen S1 que tiene una secuencia de nucleótidos que tienen una secuencia de nucleótidos con al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 2 incluye un gen S1 que tiene la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:5. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 2 se atenúa, inactiva o mata. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 2 se atenúa mediante al menos 25 pases en un huevo o una línea celular huésped.

En algunos aspectos, la presente invención incluye un reovirus aviar del grupo 1, en donde un reovirus aviar del grupo 1 incluye la cepa 94594 del reovirus aviar y derivados y progenie de la misma. En algunos aspectos, la cepa 94595 del reovirus aviar se mata, inactiva o atenúa mediante al menos 25 pases en un huevo o una línea celular huésped.

En algunos aspectos, la presente invención incluye un reovirus aviar del grupo 1, en donde un reovirus aviar del grupo 1 incluye la cepa 94826 del reovirus aviar y derivados y progenie de la misma. En algunos aspectos, la cepa 948264 se mata, inactiva o atenúa mediante al menos 25 pases en un huevo o una línea celular huésped.

En algunos aspectos, la presente invención incluye un reovirus aviar del grupo 2, en donde el reovirus aviar incluye la cepa 96139 del reovirus aviar y derivados y progenie de la misma. En algunos aspectos, la cepa 96139 del reovirus aviar se mata, inactiva o atenúa mediante al menos 25 pases en un huevo o una línea celular huésped.

En la presente invención se incluyen composiciones que incluyen uno o más de los reovirus aviares tal como se describen en la presente. Dichas composiciones adicionalmente pueden incluir un adyuvante y/o un determinante antigénico de uno o más patógenos infecciosos adicionales para aves de corral.

En la presente invención se incluyen vacunas que incluyen uno o más de los reovirus aviares de la presente invención, tal como se describe en la presente. Dichas vacunas adicionalmente pueden incluir un adyuvante y/o un determinante antigénico de uno o más patógenos infecciosos adicionales para aves de corral.

En la presente invención se incluyen composiciones inmunológicas para aumentar anticuerpos en aves de corral que incluyen uno o más de los reovirus aviares descritos anteriormente y en esta sección.

Dichas composiciones adicionalmente pueden incluir un adyuvante y/o un determinante antigénico de uno o más patógenos infecciosos adicionales para aves de corral.

La presente invención incluye un kit de diagnóstico que incluye uno o más de los reovirus aviáres descriptos anteriormente y en esta sección.

La presente invención incluye un método para producir anticuerpos anti-reovirus en aves de corral, incluyendo el método administrar un reovirus aviar aislado, una composición o una vacuna de la presente invención al ave.

La presente invención incluye un método para proteger un ave del orden *Galliformes* contra una patología o enfermedad inducida por un reovirus aviar, incluyendo el método administrar un reovirus aviar aislado, una composición o una vacuna de la presente invención al ave. La presente invención incluye un método para reducir la susceptibilidad de un ave del orden *Galliformes* contra una patología o enfermedad inducida por un reovirus aviar, incluyendo el método administrar un reovirus aviar aislado, una composición o una vacuna de la presente invención al ave.

La presente invención incluye un método para reducir la artritis viral y/o tenosinovitis en un ave del orden *Galliformes*, incluyendo el método administrar un reovirus aviar aislado, una composición o una vacuna de la presente invención al ave.

La presente invención incluye un método para prevenir la artritis viral y/o tenosinovitis en un ave del orden *Galliformes*, incluyendo el método administrar

un reovirus aviar aislado, una composición o una vacuna de la presente invención al ave.

En algunos aspectos de los métodos de la presente invención, el ave incluye un pollo o un pavo.

5 En algunos aspectos de los métodos de la presente invención, la administración incluye la administración antes o después de la eclosión.

10 En algunos aspectos de los métodos de la presente invención, la administración incluye la administración *in ovo*. En algunos aspectos, la administración *in ovo* incluye la administración aproximadamente a los 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, 15 aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días o cualquier rango de los mismos.

En algunos aspectos de los métodos de la presente invención, la administración incluye la administración a una gallina reproductora.

20 La presente invención incluye un anticuerpo que se une a un reovirus aviar del grupo 1 o reovirus aviar del grupo 2, tal como se describe en la presente y que no se une a la cepa del reovirus aviar S1133, 1733, 2408 y/o 2177. En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo 25 monoclonal.

La presente invención incluye un método para detectar la exposición a un reovirus aviar en un ave, incluyendo el método determinar que una muestra de antisueros obtenida del ave se une específicamente a un

reovirus aviar de la presente invención o a un componente del mismo.

La presente invención incluye un método para detectar la exposición a un reovirus aviar en un ave, incluyendo el método determinar que una muestra de
5 antisueros obtenida del ave se une específicamente a una proteína sigma C de un reovirus aviar del grupo 1 o reovirus aviar del grupo 2 de la presente invención.

La presente invención incluye un método para
10 detectar un agente infeccioso de reovirus aviar en una muestra, incluyendo el método detectar la hibridación de un polinucleótido que comprende la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5, o un fragmento de las mismas, con la muestra.

La presente invención incluye un método para
15 detectar un reovirus aviar en una muestra, incluyendo el método producir un producto de amplificación de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con al menos un cebador derivado de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Secuencia de nucleótidos de S1 que
20 codifica la proteína sigma C (pares de bases 1-931) del aislado de campo 94594 de la variante de AV 2012 del grupo 1 (SEQ ID NO:1).

Figura 2. Secuencia de aminoácidos de S1 que
25 codifica sigma C (aminoácidos 1-310) del aislado de campo 94594 de la variante de AV 2012 del grupo 1 (SEQ ID NO:2).

Figura 3. Secuencia de nucleótidos de S1 que
30 codifica la proteína sigma C (pares de bases 1-931) del

aislado de campo 94826 de la variante de AV 2012 del grupo 1 (SEQ ID NO:3).

Figura 4. Secuencia de aminoácidos de S1 que codifica sigma C (aminoácidos 1-310) del aislado de campo 94826 de la variante de AV 2012 del grupo 1 (SEQ ID NO:4).

Figura 5. Secuencia de nucleótidos de S1 que codifica la proteína sigma C (pares de bases 1-931) del aislado de campo 96139 de la variante de AV 2012 del grupo 2 (SEQ ID NO:5).

Figura 6. Secuencia de aminoácidos de S1 que codifica una proteína sigma C (aminoácidos 1-310) del aislado de campo 96139 de la variante de AV 2012 del grupo 2 (SEQ ID NO:6).

Figura 7. Múltiple alineación de secuencias de aminoácidos de sigma C utilizando Clustal W y árbol filogenético resultante con 1000 réplicas de análisis de remuestreo. Niveles de confianza de análisis de remuestreo indicados mediante números en cada nodo de árbol.

Figura 8. Identidad porcentual y divergencia en base a alineación múltiple generada utilizando el algoritmo Clustal W.

Figura 9. Medición de almohadilla plantar media en milímetros los días indicados en el eje X. Comenzando a los siete días de edad, se observó una diferencia evidente en el tamaño de las aves en los grupos desafiados con S1133 y 94286 en comparación con los testigos negativos. Desviación estándar indicada por barras para cada grupo.

Figura 10. Pesos corporales medios el día de la culminación (14 días de edad). Desviación estándar indicada por barras para cada grupo.

Figura 11. Las mediciones fueron tomadas del tendón flexor digital, justo debajo de la articulación de corvejón, a los 10 días de edad y nuevamente el día de la culminación, 14 días de edad. Se observó una obvia hinchazón en el grupo desafiado con 94286 a los 14 días. Desviación estándar indicada por barras para cada grupo.

Figura 12. Señales clínicas registradas el día de la culminación. Cabe destacar que 6 aves fueron retiradas el día 10 del grupo S1133 debido a cojera e incapacidad de alimentarse o beber agua.

Figura 13. Peso corporal medio en gramos en la culminación del estudio (23 días de edad). La desviación estándar se representa mediante la línea cerrada.

Figura 14. Mediciones de almohadilla plantar medias en milímetros tomadas a los 12, 14, 16, 19, 21 y 23 días de edad. La primera medición se tomó a los 12 días de edad, justo antes del desafío.

Figura 15. Mediciones de corvejón medias en milímetros tomadas a los 19, 21 y 23 días de edad. La medición del corvejón 1 se tomó en la articulación de corvejón y la medición del corvejón 2 se tomó del tendón flexor digital justo debajo de la articulación de corvejón.

Figura 16. Señales clínicas y lesiones el día de la culminación (23 días).

Figura 17. Día de serología de eclosión.

Figura 18. Pesos corporales de las aves desafiadas en el Grupo 2.

Figura 19. Medición el día 14 de hinchazón de almohadilla plantar como porcentaje de peso corporal para las aves desafiadas con el Grupo 2.

Figura 20. Medición de tendinitis como porcentaje de peso corporal para aves desafiadas con el Grupo 2.

Figura 21. Números de acceso de GenBank para aislados del Grupo 1 y Grupo 2. Las entradas sombreadas en gris representan reovirus aviar del grupo 2. Todas las otras entradas representan los reovirus del grupo 1.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE REALIZACIONES ILUSTRATIVAS

Con la presente invención, dos grupos genética y serológicamente distintos de reovirus aviares se han aislado a partir de casos clínicos de artritis viral (AV)/tenosinovitis en todo Estados Unidos y Canadá. El análisis genético de la proteína sigma C del reovirus aviar reveló nuevos genotipos del grupo 1 y grupo 2 no relacionados con las cepas de la vacuna de reovirus aviar. Una evaluación serológica de los virus reveló poca o ninguna neutralización cruzada con antisueros conocidos para vacunas de reovirus comerciales actuales. Además, estudios de patogenicidad y protección de progenie confirman que las vacunas comerciales actuales no proporcionan suficiente protección a la progenie de gallinas reproductoras vacunadas. Las cepas de vacuna de reovirus actuales se aislaron en los años 1960-1970 y no proporcionan protección contra aislados de reovirus

actualmente en circulación de casos confirmados de artritis viral/tenosinovitis.

Los reovirus aviares, junto con reovirus de mamíferos, comprenden el género *Orthoreovirus* en la familia *Reoviridae*. Estos virus contienen 10 segmentos de genoma de ARNdh delimitados en una cápside doble icosaédrica no encapsulada de aproximadamente 80 nm. Los segmentos de genoma pueden separarse en base a la movilidad electroforética en tres segmentos grandes (L1, L2, L3), tres segmentos medianos (M1, M2, M3) y cuatro segmentos pequeños (S1, S2, S3, S4) que codifican las proteínas $\lambda 1$, $\lambda 2$, $\lambda 3$, $\mu 1$, $\mu 2$, μNS , $\sigma 3$, $\sigma 1$, $\sigma 2$ y σNS , respectivamente. La proteína $\sigma 2$ es una proteína de la cápside externa que contiene epítomos neutralizantes específicos de cada grupos. También se une a ARN de doble hebra y se ha identificado como una metaloproteína de zinc. La proteína sigma C, la proteína de la cápside externa menor codificada por el segmento $\sigma 1$, es el objetivo para la caracterización molecular de reovirus aviares y es responsable de la unión celular, así como de la inducción de anticuerpos neutralizantes específicos según el tipo.

Un virión del reovirus aviar incluye una cápside, un núcleo y un complejo de nucleoproteína. La cápside del virus no está encapsulada. La cápside/nucleocápside es isométrica con simetría icosaédrica y tiene un diámetro de aproximadamente 80-82 nm. Las carcasas de cápside de viriones están compuestas por dos capas. Todas las carcasas están generalmente presentes o la carcasa externa se pierde a menudo durante

la preparación. Las cápsides parecen redondas. La estructura de la superficie de la cápside revela un patrón regular con distintas características. Es claramente visible la disposición de capsómero. No están presentes salientes superficiales. El núcleo de cápsides internas tiene un diámetro de aproximadamente 60 nm. Las preparaciones de virus contienen un componente de partícula. El núcleo es esférico y consiste en el genoma de ARNdh con un diámetro de aproximadamente 49 nm. Los extremos de las fibras sobresalen casi a través de la superficie de la cápside.

En la cepa de la vacuna de reovirus aviar S1133, el transcripto de ARNm de s1 es de 1644 nucleótidos de largo y contiene tres cistrones fuera de fase y parcialmente superpuestos. El primer cistrón (ORF-1, nucleótidos 25-319) expresa p10, el segundo cistrón (ORF-2, nucleótidos 293-731) expresa p17 y el tercer cistrón (ORF-3, nucleótidos 630-1608) expresa la proteína C de unión celular.

El análisis de secuencias de aminoácidos de sigma C de las cepas de vacuna de reovirus S1133, 1733, 2408 y 2177 revela una similitud >99% entre estas cepas de vacuna. La caracterización genotípica de aislados de campo de reovirus incluye una comparación de aislados de campo con cepas de vacuna, así como, todas las secuencias de reovirus disponibles en el dominio público y base de datos de PDRC. La similitud del genotipo se informa para aislados de campo como la similitud porcentual más alta con otra secuencia, ya sea un aislado de campo o cepa de vacuna.

Con la presente invención, dos grupos genética y serológicamente distintos de reovirus aviares se han aislado a partir de casos clínicos de tenosinovitis. El análisis genético de la proteína sigma C del reovirus aviar reveló nuevos genotipos no relacionados con las cepas de vacuna de reovirus aviar actuales. La evaluación serológica de los virus reveló poca o ninguna neutralización cruzada con antisueros conocidos para vacunas de reovirus comerciales actuales. Además, se han realizado estudios de patogenicidad y protección de progenie para confirmar que las vacunas comerciales actuales no proporcionan suficiente protección para la progenie de gallinas reproductoras vacunadas.

Los dos grupos genéticos/serológicos de aislados de campo descritos en la presente se denominan variante de AV 2012 del grupo 1 (al que también se hace referencia en la presente como "reovirus aviar del grupo 1") y variante de AV 2012 del grupo 2 (al que también se hace referencia en la presente como "reovirus aviar del grupo 2"). Los reovirus de la variante de AV 2012 del grupo 1 y/o variante de AV 2012 del grupo 2 pueden utilizarse en una vacuna atenuada viva y muerta/inactiva. En algunos aspectos, dicha vacuna puede ser una vacuna autógena.

Un reovirus aviar del grupo 1 de la presente invención puede tener una proteína sigma C con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 50% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 55% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 65%

de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 70%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 75%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 80%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 85%
5 de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98%
10 de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99%
de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2. En algunos
aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 de la presente
invención puede tener una proteína sigma C que tiene una
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. En algunas
15 realizaciones, un reovirus aviar del grupo 1 tal como se
describe en la presente tiene una proteína sigma C con al
menos una modificación de tipo sustitución respecto a la
SEQ ID NO:2.

Un reovirus aviar del grupo 1 de la presente
20 invención puede tener una proteína sigma C con una
secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 50%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 55%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 60%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 65%
25 de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 70%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 75%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 80%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 85%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90%
30 de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95%

de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97%
de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98%
de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99%
5 de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:4. En algunos
aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 de la presente
invención puede tener una proteína sigma C que tiene una
secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:4. En algunas
realizaciones, un reovirus aviar del grupo 1 tal como se
10 describe en la presente tiene una proteína sigma C con al
menos una modificación de tipo sustitución respecto a la
SEQ ID NO:4.

Un reovirus aviar del grupo 1 de la presente
invención puede tener una proteína sigma C codificada por
15 una secuencia de nucleótidos con al menos aproximadamente
50% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
55% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
60% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
65% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
20 70% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
75% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
80% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
25 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
96% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
97% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente
98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente
99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1. En
30 algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 de la

presente invención puede tener una proteína sigma C codificada por una secuencia de nucleótidos que tienen la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, un reovirus aviar del grupo 1 tal como se describe en la presente tiene una

5 proteína sigma C codificada por una secuencia de nucleótidos con al menos una modificación de tipo sustitución respecto a la SEQ ID NO:1.

Un reovirus aviar del grupo 1 de la presente invención puede tener una proteína sigma C codificada por una secuencia de nucleótidos con al menos aproximadamente

10 50% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 55% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 65% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente

15 70% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente

20 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:3. En

25 algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 de la presente invención puede tener una proteína sigma C codificada por una secuencia de nucleótidos que tienen la SEQ ID NO:3. En algunas realizaciones, un reovirus aviar del grupo 1 tal como se describe en la presente tiene una

30 proteína sigma C codificada por una secuencia de

nucleótidos con al menos una modificación de tipo sustitución respecto a la SEQ ID N0:3.

En algunas realizaciones, un reovirus aviar del grupo 1 es uno de los representados en la Tabla 21 o una progenie o derivado del mismo.

En algunas realizaciones, un reovirus aviar del grupo 1 es el reovirus aviar CK/945494/Tendón/ GA/2012 (al que también se hace referencia en la presente como "aislado de campo 94594 de la variante de AV 2012 del grupo 1" o "94594") o una progenie o derivado del mismo.

En algunas realizaciones, un reovirus aviar del grupo 1 es el reovirus aviar CK/94826/Tendón/ GA/2012 (al que también se hace referencia en la presente como "aislado de campo 94826 de la variante de AV 2012 del grupo 1" o "94826") o una progenie o derivado del mismo.

Un reovirus aviar del grupo 2 de la presente invención puede tener una proteína sigma C con una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID N0:6. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 2 de la presente invención puede tener una proteína sigma C que tiene una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N0:6. En algunas realizaciones, un reovirus aviar del grupo 2 tal como se describe anteriormente tiene una proteína sigma C con al

menos una modificación de tipo sustitución respecto a la SEQ ID NO:6.

Un reovirus aviar del grupo 2 de la presente invención puede tener una proteína sigma C codificada por una secuencia de nucleótidos con al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:5. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 de la presente invención puede tener una proteína sigma C codificada por una secuencia de nucleótidos que tienen la SEQ ID NO:5. En algunas realizaciones, un reovirus aviar del grupo 1 tal como se describe en la presente tiene una proteína sigma C codificada por una secuencia de nucleótidos con al menos una modificación de tipo sustitución respecto a la SEQ ID NO:5.

En algunas realizaciones, un reovirus aviar del grupo 2 es uno de los representados en la Tabla 21 o una progenie o derivado del mismo.

En algunas realizaciones, un reovirus aviar del grupo 2 es el reovirus aviar CK/96139/Tendón/ GA/2012 (al que también se hace referencia en la presente como "aislado de campo 96139 de la variante de AV 2012 del grupo 2" o "96139") o una progenie o derivado del mismo.

Un reovirus aviar tal como se describe en la presente, o una línea celular infectada con dicho virus,

puede depositarse en la American Type Culture Collection (ATCC®), 10801 University Boulevard, Manassas, AV 20110-2209, Estados Unidos. Dicho depósito puede estar de acuerdo con el Tratado de Budapest sobre el Reconocimiento Internacional del Depósito de Microorganismos a efectos del Procedimiento de Patentes.

El reovirus aviar de acuerdo con la invención puede prepararse mediante métodos convencionales, incluyendo, a modo no taxativo, cualquiera de los descriptos en la sección de ejemplos incluida en la presente. En resumen, un sustrato capaz de soportar la replicación de un reovirus aviar se inocular con un reovirus aviar de la presente invención y se propaga hasta que el virus se replica hasta una titulación infecciosa o contenido de masa de antígeno deseado. Luego se cosecha material que contiene reovirus. Sustratos adecuados pueden incluir cultivos celulares primarios (aviares), tales como, por ejemplo, células del hígado de embriones de pollo, fibroblastos de embriones de pollo o células de riñón de pollo, líneas celulares de mamífero, tales como, por ejemplo, la línea celular VERO o la línea celular BGM-70, o líneas celulares aviares, tales como, por ejemplo, QT-35, QM-7 o LMH. En algunas aplicaciones, pueden utilizarse huevos embrionados.

La presente invención incluye un método para detectar la exposición a un reovirus aviar del grupo 1 y/o del grupo 2 en un ave, incluyendo el método determinar si una muestra de antisueros obtenida del ave se une específicamente a un virus, línea celular, granulado celular, sobrenadante y/o polipéptido de la

presente invención. Por ejemplo, la presente invención incluye el uso de uno o más reovirus aviares de la presente invención en métodos para detectar la exposición a un reovirus aviar en un ave, incluyendo el método
5 determinar que una muestra de antisueros obtenida del ave se une específicamente a un reovirus aviar de la presente invención. Dicho reovirus aviar incluye cualquiera de los descritos en la presente, incluyendo, a modo no taxativo, cualquiera de las cepas del reovirus aviar que
10 se indican en las Figuras 21 incluyendo, a modo no taxativo, la cepa 94594, 94826 o 96139 del reovirus aviar. Dicho reovirus aviar puede inactivarse, matarse y/o liofilizarse. La presente invención también incluye kits de diagnóstico que incluyen uno o más de los
15 reovirus aviares de la presente invención. Dicho kit puede incluir componentes adicionales, tales como por ejemplo, un virus testigo positivo, un virus testigo negativo, un anticuerpo secundario y/o un marcador detectable.

20 La presente invención incluye un polipéptido de sigma C aislado que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos aproximadamente 50% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 55% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 60% de
25 identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 65% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, al
30 menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al

menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:6. En algunos aspectos, la presente invención incluye un polipéptido de sigma C aislado que tiene una secuencia de aminoácidos con la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:6. En algunos aspectos, la presente invención incluye un polipéptido de sigma C aislado que tiene una secuencia de aminoácidos con al menos una modificación de tipo sustitución respecto a la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y/o SEQ ID NO:6.

La presente invención incluye un polipéptido de sigma C aislado que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos con al menos aproximadamente 50% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 55% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 65% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia, con al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 96% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 97%

de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 y/o SEQ ID NO:5. En algunos aspectos, la presente invención incluye un polipéptido de sigma C aislado que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de nucleótidos SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 y/o SEQ ID NO:5. En algunos aspectos, la presente invención incluye un polipéptido de sigma C aislado que tiene una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos con al menos una modificación de tipo sustitución respecto a la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 y/o SEQ ID NO:5.

La presente invención incluye polipéptidos tal como se describe en la presente, truncamientos y fragmentos de los mismos. Truncamientos incluyen, a modo no taxativo, secuencias de aminoácidos en las cuales uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más aminoácidos se eliminan del extremo amino de una secuencia de aminoácidos y/o uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más aminoácidos se eliminan del extremo carboxi de una secuencia de aminoácidos.

Fragmentos incluyen, a modo no taxativo, por ejemplo, fragmentos que tienen aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100, aproximadamente 150, aproximadamente 200, aproximadamente 250, aproximadamente 300, aproximadamente 350, aproximadamente

400, aproximadamente 450, aproximadamente 500, aproximadamente 550, aproximadamente 600, aproximadamente 650 y aproximadamente 700 residuos de aminoácidos consecutivos de una secuencia descrita en la presente.

5 Fragmentos también incluyen, por ejemplo, fragmentos de un rango de tamaños de cualquier combinación de los tamaños de fragmentos precedentes. Fragmentos incluyen, a modo no taxativo, por ejemplo, fragmentos que tienen al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 50, al menos 75, al menos 100, al menos 150, al menos 200, al menos 250, al menos 300, al menos 350, al menos 400, al menos 450, al menos 500, al menos 550, al menos 600, al menos 650 y al menos 700 residuos de aminoácidos consecutivos de una secuencia descrita en la presente.

15 La presente invención incluye polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos con uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce, quince, dieciséis, diecisiete, dieciocho, diecinueve, veinte o más cambios de aminoácidos con respecto a una secuencia de aminoácidos descrita en la presente, o fragmentos de la misma. Dichos cambios de aminoácidos incluyen, a modo no taxativo, cambios de aminoácidos conservadores.

25 La presente invención incluye el uso de uno o más polipéptidos de la presente invención en métodos para detectar la exposición a un reovirus aviar en un ave, incluyendo el método determinar que una muestra de antisueros obtenida del ave se une específicamente a un polipéptido de la presente invención. Dichos polipéptidos

incluyen cualquiera de los descriptos en la presente, incluyendo, a modo no taxativo, las SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 y SEQ ID NO:6, y derivados y fragmentos de las mismas. La presente invención también incluye kits de diagnóstico que incluyen uno o más de los polipéptidos de la presente invención. Dicho kit puede incluir componentes adicionales, tales como por ejemplo, un polipéptido testigo positivo, un polipéptido testigo negativo, un anticuerpo secundario, un marcador detectable.

La presente invención incluye una secuencia de polinucleótidos aislada que tiene al menos aproximadamente 50% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 55% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 65% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5. La presente invención incluye una secuencia de polinucleótidos aislada que tiene la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5, un truncamiento o fragmento de la misma. En algunos aspectos, la presente invención incluye una secuencia de

polinucleótidos aislada tal como se describe en la presente con al menos una modificación de tipo sustitución respecto a la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 o SEQ ID NO:5.

5 La presente invención incluye una secuencia de polinucleótidos aislada que tiene al menos aproximadamente 50% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 55% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 60% de identidad de secuencia, al menos
10 aproximadamente 65% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 75% de identidad de secuencia, al menos
15 aproximadamente 80% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 85% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 90% de identidad de secuencia, al menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia, al menos
20 aproximadamente 98% de identidad de secuencia o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia con una secuencia de nucleótidos que codifica SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6. En algunos aspectos, la presente invención incluye una secuencia de polinucleótidos aislada que tiene la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6. En algunos aspectos, la presente invención incluye
25 una secuencia de polinucleótidos aislada tal como se describe en la presente que codifica una secuencia de aminoácidos con al menos una modificación de tipo sustitución respecto a la SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 o SEQ ID NO:6.

La presente invención incluye secuencias de polinucleótidos que se hibridan con una secuencia de nucleótidos descrita en la presente en diversas condiciones y fragmentos de las mismas. Las condiciones de rigurosidad incluyen, a modo no taxativo, rigurosidad moderada y alta. Las condiciones de hibridación de rigurosidad alta pueden ser, por ejemplo, 6X SSC, 5X Denhardt, 0.5% de dodecil sulfato de sodio (SDS) y 100 ug/ml de ADN de esperma de salmón fragmentado y desnaturalizado hibridado durante la noche a 65°C y lavado en 2X SSC, 0.1% de SDS al menos una vez a temperatura ambiente durante aproximadamente 10 minutos seguido por al menos un lavado a 65°C durante aproximadamente 15 minutos seguido por al menos un lavado en 0.2X SSC, 0.1% de SDS a temperatura ambiente durante al menos 3 a 5 minutos.

La presente invención incluye una secuencia de polinucleótidos descritos en la presente que tiene una sustitución de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce quince, veinte o más nucleótidos. La presente invención también incluye las secuencias de polinucleótidos descritas en la presente en las cuales el uso del codón se ha adaptado para optimizar la expresión en una célula huésped dada. Por ejemplo, el uso del codón puede adaptarse para optimizar la expresión en células huésped incluyendo, a modo no taxativo, baculovirus, levadura, *E. coli*, aves de corral o células humanas. Dicha adaptación puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas en la técnica.

La presente invención incluye cebadores incluyendo, a modo no taxativo, cualquiera de los cebadores descritos en la presente y cebadores que pueden utilizarse para generar una secuencia descrita en la presente, o un fragmento de las mismas, en una reacción de PCR. En algunas realizaciones, un cebador puede incluir al menos 5, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 30, al menos 35 o al menos 40 residuos de nucleótidos. En algunas realizaciones, un cebador puede incluir no más de 10, no más de 15, no más de 20, no más de 25, no más de 30, no más de 35, no más de 40, no más de 45, no más de 50, no más de 55 o no más de 60 residuos de nucleótidos. Dichos residuos de nucleótidos pueden ser secuencias consecutivas o su complemento. También se incluyen pares de cebadores que incluyen al menos uno de los cebadores descritos en la presente, complementos de los mismos o cebadores derivados de dichas secuencias. También se incluyen en la presente invención los productos de amplificación producidos por dichos cebadores.

La presente invención incluye un vector que incluye una secuencia de polinucleótidos de la presente invención. En algunos aspectos, el vector es un vector de vacuna. La presente invención incluye un polipéptido aislado codificado por un polinucleótido de la presente invención.

La presente invención incluye el uso de una o más secuencias de polinucleótidos de la presente invención en métodos para detectar un agente infeccioso de reovirus aviar en una muestra. Dichos métodos

incluyen, por ejemplo, un método que incluye detectar la hibridación de una secuencia de polinucleótidos de la presente invención con la muestra y un método que incluye producir un producto de amplificación de reacción en cadena de polimerasa (PCR) con al menos un cebador derivado de una secuencia de polinucleótidos de la presente invención. Dichas secuencias de polinucleótidos incluyen cualquiera de las descritas en la presente incluyendo, a modo no taxativo, la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 y SEQ ID NO:5. La presente invención también incluye kits de diagnóstico que incluyen una o más de las secuencias de polinucleótidos de la presente invención. La presente invención incluye kits de diagnóstico que incluyen uno o más de un virus, línea celular, granulado celular, sobrenadante, secuencia de polinucleótidos, vector y/o polipéptido de la presente invención.

Un reovirus aviar tal como se describe en la presente puede ser un virus inactivado o muerto. El objetivo de la inactivación de un virus es prevenir la replicación viral y, en general, esto puede alcanzarse mediante medios químicos o físicos. La inactivación química puede llevarse a cabo mediante tratamiento de los virus con, por ejemplo, enzimas, formaldehído, β -propiolactona, etileno-imina o un derivado de los mismos. La inactivación física puede llevarse a cabo, por ejemplo, sometiendo los virus a radiación energética, tal como luz UV.

Un reovirus aviar tal como se describe en la presente puede demostrar virulencia reducida y servir como virus atenuado vivo a los efectos de la vacunación.

La atenuación de un reovirus aviar útil en la puesta en práctica de la presente invención puede alcanzarse mediante métodos bien conocidos en la técnica para este propósito. Por ejemplo, un reovirus aviar aislado de acuerdo con la invención puede atenuarse mediante un pase en huevos de gallina embrionados, animales vivos o líneas celulares adecuadas. Dichas líneas celulares pueden incluir, por ejemplo, cultivos celulares primarios (aviares) tal como, por ejemplo, células de hígado de embrión de pollo, fibroblastos de embrión de pollo o células de riñón de pollo, líneas celulares de mamífero, tales como, por ejemplo, la línea celular VERO o la línea celular BGM-70, o líneas celulares aviares, tales como, por ejemplo, QT-35, QM-7 o LMH. Dicho virus con pases regresivos puede obtenerse, por ejemplo, con aproximadamente 10 a aproximadamente 100 pases. Dicho virus con pases regresivos puede obtenerse, por ejemplo, con uno o más pases regresivos, dos o más pases regresivos, tres o más pases regresivos, cuatro o más pases regresivos, cinco o más pases regresivos, diez o más pases regresivos, quince o más pases regresivos, veinte o más pases regresivos, veinticinco o más pases regresivos, cincuenta o más pases, setenta y cinco o más pases, o cien o más pases. Dicho virus con pases regresivos puede obtenerse, por ejemplo, con aproximadamente un pase regresivo, aproximadamente dos pases regresivos, aproximadamente tres pases regresivos, aproximadamente cuatro pases regresivos, aproximadamente cinco pases regresivos, aproximadamente diez pases regresivos, aproximadamente quince pases regresivos,

aproximadamente veinte pases regresivos, aproximadamente veinticinco pases regresivos, aproximadamente cincuenta pases, aproximadamente setenta y cinco, aproximadamente cien pases o cualquier rango de los mismos.

5 Por ejemplo, la presente invención incluye reovirus aviares atenuados por un pase en fibroblastos de embrión de pollo primarios con posterior purificación de placa. Este proceso puede repetirse, por ejemplo, aproximadamente 10 a aproximadamente 100 veces para
10 atenuar el virus. Las pruebas de patogenicidad pueden llevarse a cabo en varios puntos de tiempo, por ejemplo, en el pase 25, en el pase 50, en el pase 75, en el pase 100 y en puntos de tiempo adicionales.

 La presente invención incluye un método para
15 producir una respuesta inmune anti-reovirus aviar de un grupo 1 y/o grupo 2 en aves de corral, incluyendo el método administrar un virus, línea celular, granulado celular, sobrenadante, secuencia de polinucleótidos, vector y/o polipéptido aislado de la presente invención.
20 En algunos aspectos, inmunidad incluye inmunidad humoral y/o celular. En algunos aspectos, inmunidad incluye inmunidad de las mucosas.

 La presente invención incluye un método para
25 prevenir una infección por reovirus aviar en aves de corral, incluyendo el método administrar una composición que incluye un virus, línea celular, granulado celular, sobrenadante, secuencia de polinucleótidos, vector y/o polipéptido aislado de la presente invención.

 En algunos aspectos de los métodos de la
30 presente invención, la administración incluye inyección,

pulverización, administración oral o administración respiratoria. En algunos aspectos de los métodos de la presente invención, la administración induce la inmunidad de las mucosas. En algunos aspectos de los métodos de la presente invención, la administración incluye la administración *in ovo*. En algunos aspectos, la administración *in ovo* incluye la administración a aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días o cualquier rango de los mismos.

La presente invención incluye vacunas y composiciones inmunogénicas que incluyen uno o más de los virus, secuencias de polinucleótidos, vectores y/o polipéptidos aislados descritos en la presente. En algunas realizaciones, el virus está vivo. En algunas realizaciones, el virus se atenúa o inactiva. En algunas realizaciones, el virus se inactiva o mata. En algunas realizaciones, el virus, las composiciones o la vacuna se liofilizan. En algunas realizaciones, el virus, las composiciones o la vacuna se congelan.

Dichas composiciones y vacuna pueden administrarse como el componente activo para inmunizar un ave para provocar una respuesta inmune a un reovirus aviar del grupo 1 y/o del grupo 2 y/o inducir inmunidad contra dicho reovirus aviar. Inmunidad puede incluir la inducción de un nivel superior de protección en una población de aves luego de la vacunación en comparación con un grupo sin vacunar. La respuesta inmune puede, o

no, conferir inmunidad protectora. Una respuesta inmune puede, por ejemplo, incluir una o más de una respuesta inmune mediada por células que implica la producción de linfocitos en respuesta a la exposición al antígeno, y/o una respuesta inmune humoral que implica la producción de linfocitos en plasma (células B) en respuesta a la exposición al antígeno con posterior producción de anticuerpos. La inmunización puede resultar en la reducción, inhibición o prevención de uno o más de los síntomas de la artritis viral (AV)/tenosinovitis asociados al reovirus aviar. Dichos síntomas pueden incluir uno o más de disminución del peso corporal, disminución en la producción de huevos, mortalidad, lesiones macroscópicas (incluyendo, a modo no taxativo, tendinitis, tenosinovitis, ruptura de tendón e hidropericardio) y cambios histológicos (incluyendo, a modo no taxativo, tenosinovitis linfocítica, epicarditis linfocítica y miocarditis linfocítica).

Una vacuna o composición inmunogénica de la presente invención también puede incluir uno o más compuestos con actividad adyuvante. Compuestos o composiciones adecuados para este propósito incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, óxido de aluminio, aceites vegetales, aceites animales, emulsión de aceite en agua o agua en aceite en base a, por ejemplo, un aceite mineral, tal como Bayol FTM o Marcol 52TM, adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund o un aceite vegetal tal como acetato de vitamina E y saponinas.

Una vacuna o composición inmunogénica de la presente invención puede incluir uno o más portadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Una vacuna o composición inmunogénica de la presente invención también puede contener uno o más estabilizantes. Puede utilizarse cualquier estabilizante adecuado, incluyendo carbohidratos tales como sorbitol, manitol, almidón, sacarosa, dextrina o glucosa; proteínas tales como albúmina o caseína; y soluciones amortiguadoras tales como fosfato de metal alcalino y similares. Un estabilizante es particularmente ventajoso cuando se prepara una vacuna seca mediante liofilización.

Una vacuna o composición inmunogénica de la presente invención adicionalmente puede incluir uno o más inmunógenos derivados de otros patógenos infecciosos para aves de corral. Dichos inmunógenos pueden derivar de, por ejemplo, virus de enfermedad de Marek (MDV), virus de bronquitis infecciosa (IBV), virus de enfermedad de Newcastle (NDV), virus del síndrome de la caída de la postura (EDS), virus de rinotraqueítis de pavo (TRTV), poxvirus, reovirus, parvovirus de pollo y virus de nefritis aviar (incluyendo, a modo no taxativo, ANV-1 y ANV-2).

Una vacuna o composición inmunogénica de la presente invención puede administrarse mediante cualquier método conocido adecuado de inoculación de aves de corral, incluyendo nasalmente, oftálmicamente, mediante inyección, en agua potable, en la comida, mediante exposición, *in ovo*, maternalmente, mediante inhalación respiratoria y similares. La composición o vacuna

inmunogénica puede administrarse mediante técnicas de administración masivas tales como colocando la vacuna en agua potable o pulverizándola en el ambiente. Cuando se administra mediante inyección, la composición o vacuna
5 inmunogénica puede administrarse parenteralmente. La administración parenteral incluye, por ejemplo, administración mediante inyección intravenosa, subcutánea, intramuscular o intraperitoneal.

En algunas realizaciones, una vacuna viva puede
10 administrarse en una dosis de no más de 10^2 unidades de titulación (en donde las unidades de titulación se definen en el Título 9, Sección 113.332, Código Federal de Regulaciones) por ave, y una vacuna inactivada puede contener el equivalente antigénico de 10^4 - 10^{10} TCID₅₀ por
15 ave (en donde TCID es una abreviación para Dosis Infecciosa de Cultivo Tisular).

Las composiciones y vacunas de la presente invención pueden ser básicamente puras. Tal como se usa en la presente, "básicamente pura" significará material
20 esencialmente libre de cualquier macromolécula similar u otras entidades biológicas que se encontrarían normalmente con ellas en la naturaleza.

Las composiciones y vacunas de la presente invención pueden administrarse a aves de cualquiera de
25 una variedad de especies aviares que son susceptibles a infección con un reovirus aviar incluyendo, a modo no taxativo, aves de corral, aves del orden *Galliformes* y especies de aves exóticas. Aves del orden *Galliformes* incluyen, a modo no taxativo, gallinas, pavos, urogallo, codornices y faisanes. Tal como se usa en la presente,
30

aves de corral incluye aves domesticadas que se mantienen a efectos de recoger sus huevos o matarlas por su carne y/o plumas. Éstas son más típicamente miembros del superorden *Galloanserae* (ave de corral), especialmente el orden *Galliformes* (que incluye, por ejemplo, pollos, codorniz, pavos y urogallo) y la familia *Anatidae* (en el orden *Anseriformes*), conocidas comúnmente como “aves acuáticas” (incluyendo, por ejemplo, patos, gansos y cisnes). Aves de corral también puede incluir otras aves que se matan por su carne, tales como palomas o torcazas o aves consideradas de caza, como faisanes. Pollos incluye, a modo no taxativo, gallinas, gallos, aves de engorde, ponedoras, reproductoras, la descendencia de gallinas reproductoras y ponedoras. Tal como se usa en la presente, la expresión “susceptible a” significa la posibilidad o realidad de una respuesta perjudicial al microorganismo mencionado, tal como, por ejemplo, vigor reducido o deficiencia de crecimiento, cuando se compara con individuos o grupos no susceptibles y/o uno o más estados patológicos que indican una infección por virus aviar.

La vacuna de la presente invención puede administrarse a aves de corral antes o después de la eclosión. Las aves de corral pueden recibir una vacuna a una variedad de edades. Por ejemplo, las aves de engorde pueden vacunarse *in ovo*, a un día de edad o a 2-3 semanas de edad. Las aves ponedoras o aves reproductoras pueden vacunarse, por ejemplo, a aproximadamente 6-12 semanas de edad y reforzarse a aproximadamente 16-20 semanas de edad. Dichas aves ponedoras o aves reproductoras pueden

vacunarse a aproximadamente 6, a aproximadamente 7, a aproximadamente 8, a aproximadamente 9, a aproximadamente 10, a aproximadamente 11 o a aproximadamente 12 semanas de edad. Dichas aves ponedoras o aves reproductoras pueden reforzarse a aproximadamente 16, a aproximadamente 17, a aproximadamente 18, a aproximadamente 19 o a aproximadamente 20 semanas de edad. La descendencia de dichas aves ponedoras o aves reproductoras puede demostrar una titulación de anticuerpo para un polipéptido tal como se describe en la presente, que puede prevenir o mitigar los síntomas de una infección por reovirus aviar en la descendencia. La vacunación *in ovo* puede realizarse, por ejemplo, a aproximadamente 13 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 15 días, aproximadamente 16 días, aproximadamente 17 días, aproximadamente 18 días, aproximadamente 19 días, aproximadamente 20 días o a cualquier rango de los mismos.

Los pollos pueden vacunarse a cualquier edad adecuada y tienen generalmente aproximadamente de uno a tres días de edad antes de la primera vacuna. Los pollos pueden vacunarse sólo una vez o, si se utilizan dos dosis de vacuna, la primera se aplica, por ejemplo, cuando los pollos tienen 3 días a una semana de edad y posteriormente después de 1-10 semanas.

Pueden administrarse múltiples dosis de la composición a lo largo de la vida de la gallina. Dado que la inmunidad maternal es una fuente principal para proporcionar protección a la progenie de gallinas de engorde, las gallinas reproductoras típicamente se

vacunan, aunque las gallinas de engorde pueden vacunarse si así se desea.

También se incluyen en la presente invención antisueros y anticuerpos que se unen a un reovirus aviar del grupo 1 y/o un reovirus aviar del grupo 2. En algunos aspectos, un antisuero o anticuerpo no se une a las cepas de vacuna comerciales actuales de reovirus aviar, tales como, por ejemplo, la cepa del reovirus aviar S1133, 1733, 2408 y/o 2177. Anticuerpos útiles en la puesta en práctica de la presente invención incluyen anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos o fragmentos de los mismos y también se incluyen anticuerpo biespecífico, anticuerpo sintético, fragmento de anticuerpo, tal como fragmentos Fab, Fv, F(ab)₂ o scFv, anticuerpos de cadena simple o un derivado modificado químicamente de cualquiera de los mismos. Dichos anticuerpos pueden utilizarse en métodos de diagnóstico y kits de diagnóstico. En algunos aspectos, un anticuerpo anti-reovirus aviar puede unirse a un sustrato sólido.

La presente invención proporciona métodos para detectar y/o medir la cantidad de un reovirus aviar del grupo 1 o del grupo 2 en una muestra obtenida de un ave. En algunos aspectos, un reovirus aviar del grupo 1 incluye una proteína sigma C con una secuencia de aminoácidos tal como se describe en la presente incluyendo, a modo no taxativo, una proteína sigma C que tiene la SEQ ID N0:2 o SEQ ID N04 o un fragmento o derivado de las mismas. En algunos aspectos, un reovirus

5 aviar del grupo 2 incluye una proteína sigma C con una
secuencia de aminoácidos tal como se describe en la
presente incluyendo, a modo no taxativo, una proteína
sigma C que tiene la SEQ ID NO:6 o un fragmento o
derivado de la misma. Dicho método puede incluir poner en
contacto una muestra con un anticuerpo que se una
selectivamente a un reovirus aviar tal como se describe
en la presente y/o una proteína sigma C tal como se
describe en la presente y medir la cantidad de unión del
10 anticuerpo a un virus o proteína en la muestra. La
muestra puede ser cualquier material biológico, tal como
tejido, hueso, sangre, orina o heces. Los métodos de este
aspecto de la invención son útiles, por ejemplo, para
determinar si las aves de corral están infectadas con un
15 reovirus aviar de la presente invención. Los animales
infectados pueden sacrificarse para prevenir la
propagación del reovirus a otros animales.

Tal como se usa en la presente, "aislado" se
refiere a material apartado de su ambiente original (por
ejemplo, el ambiente natural si está en la naturaleza) y,
20 de esta forma, "la mano del hombre" lo altera con
respecto a su estado natural.

La expresión "y/o" significa uno o todos los
elementos mencionados o una combinación de dos o más de
25 los elementos mencionados.

Las palabras "preferido" y "preferiblemente" se
refieren a realizaciones de la invención que pueden
proporcionar ciertos beneficios en ciertas
circunstancias. Sin embargo, también pueden preferirse
30 otras realizaciones en las mismas u otras circunstancias.

Adicionalmente, la mención de una o más realizaciones preferidas no implica que otras realizaciones no sean útiles y no se pretende excluir otras realizaciones del alcance de la invención.

5 El término "comprende" y variaciones del mismo no tienen un significado limitante cuando estos términos aparecen en la descripción y las reivindicaciones.

A menos que se especifique de otra forma, "un", "uno", "el" y "al menos uno" se utilizan de forma
10 indistinta y significan uno o más de uno.

También en la presente, las menciones de rangos numéricos mediante extremos incluyen todos los números dentro de dicho rango (por ejemplo, 1 a 5 incluye 1, 1.5, 2, 2.75, 3, 3.80, 4, 5, etc.).

15 En cualquier método divulgado en la presente que incluya pasos discretos, los pasos pueden llevarse a cabo en cualquier orden posible. Y, según sea apropiado, cualquier combinación de dos o más pasos pueden llevarse a cabo simultáneamente.

20 A menos que se indique de otra forma, se comprenderá que todos los números que expresan cantidades de componentes, pesos moleculares, etc., utilizados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones pueden modificarse en cualquier caso por el término
25 "aproximadamente". Por consiguiente, a menos que se indique lo contrario, los parámetros numéricos indicados en la memoria descriptiva y las reivindicaciones son aproximaciones que pueden variar dependiendo de las propiedades deseadas que se busca obtener mediante la
30 presente invención. Como mínimo, y no como un intento de

limitar la doctrina de los equivalentes del alcance de las reivindicaciones, cada parámetro numérico debería interpretarse al menos a la luz del número de dígitos significativos proporcionado y aplicando técnicas de redondeo corrientes.

A pesar de que los rangos y parámetros numéricos que establecen el alcance amplio de las realizaciones son aproximaciones, los valores numéricos establecidos en los ejemplos específicos se proporcionan de la manera más precisa posible. Todos los valores numéricos, sin embargo, contienen inherentemente un rango que necesariamente resulta de la desviación estándar encontrada en las mediciones de las pruebas respectivas.

Todos los títulos se proporcionan para la conveniencia del lector y no deberán utilizarse para limitar el significado del texto que sigue al título, a menos que así se especifique.

En varias partes a lo largo de esta solicitud se proporcionan lineamientos a través de listas de ejemplos, los cuales pueden utilizarse en varias combinaciones. En cada caso, la lista indicada sirve solo como un grupo representativo y no deberá interpretarse como una lista exclusiva. Se comprenderá también que los ejemplos, materiales, cantidades y procedimientos particulares deben interpretarse de forma amplia de acuerdo con el alcance y el espíritu de la invención, tal como se especifica en la presente.

La presente invención es ilustrada por los siguientes ejemplos. Se comprenderá también que los ejemplos, materiales, cantidades y procedimientos

particulares deben interpretarse de forma amplia de acuerdo con el alcance y el espíritu de la invención tal como se especifica en la presente.

Ejemplos

5 Ejemplo 1

Aislamiento y caracterización de variantes de reovirus

10 Este ejemplo describe el aislamiento de variantes de reovirus a partir de tendones en varios casos clínicos de tenosinovitis y/o cojera en pollos de engorde, con edades entre 2.5-8 semanas presentados al Centro de Diagnóstico e Investigación de Aves de Corral. Los reovirus aviaries se caracterizaron por una secuenciación de la proteína sigma C y ensayos
15 serológicos.

Materiales y métodos

Aislamiento del virus. Los aislados de campo de reovirus Ck/94594 Tendón/GA/2012, Ck/94826 Tendón/GA/2012 y Ck/96139 Tendón/GA/2012 se aislaron en el Centro de
20 Diagnóstico e Investigación de Aves de Corral de la Universidad de Georgia a partir de los tendones de pollos de engorde comerciales que exhibían signos clínicos de artritis viral y tenosinovitis. Los tendones y aspirados sinoviales de pollos clínicamente afectados se homogenizaron de forma individual en medios de transporte
25 de virus con antibióticos. Los tejidos homogenizados se filtraron a través de un filtro de jeringa de 0.45 micrones. Los filtrados se incubaron con antisueros de Reovirus S1133 (Charles River, SPAFAS, Wilmington, MA) a
30 37°C durante 1 hora. Luego de la neutralización se

inocularon 0.2ml de homogenado en células hepáticas de embriones de pollo primarios para un total de cuatro pases. Al desarrollarse el 70-80% del efecto citopático, observado como formación sincitial, los cultivos celulares se congelaron y almacenaron a -80°C. Los cultivos celulares se congelaron y descongelaron tres veces antes de su posterior pase de cultivo celular.

Extracción de ARN. Se extrajo ARN viral total de pases de células hepáticas de embriones de pollos primarios mediante el kit RNeasy (Qiagen, Valencia, CA) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Brevemente, 48 horas después de la infección, se decantaron los medios de cultivo celular, se recubrió la monocapa con 300 µl de solución amortiguadora RLT que contenía β-mercaptoetanol 0.143 M y se raspó con un raspador de células tal como lo recomendó el fabricante.

RT-PCR. Se produjo un ADNc correspondiente al gen S1 mediante transcripción inversa y PCR utilizando transcriptasa inversa SUPERSRIPT™ III RNasa H y ADN polimerasa PLATINUM®Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA) con los cebadores publicados anteriormente P1 (AGTATTTGTGAGTACG ATTG (SEQ ID NO:7)) y P4 (GGCGCCACACCTTAGGT (SEQ ID NO:8)) (Kant et al., 2003, Vet Res; 34:203-212). Los productos amplificados de 1.1 kb se separaron sobre 1.0% de gel de agarosa, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con un transiluminador UV. El fragmento se extrajo, se purificó con kit de extracción de QIAEX II (Qiagen Inc., Valencia, CA), se eluyó en agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) y se almacenó a -80°C.

Secuenciación de nucleótidos de productos
amplificados y clones S1. Los productos de PCR
purificados con gel se secuenciaron directamente mediante
secuenciación de ADN de doble hebra con
5 dideoxinucleótidos etiquetados fluorescentemente y
polimerasa Taq y se realizaron sobre un secuenciador
automizado ABI 9700 (Applied Biosystems Inc., Foster
City, CA). Se utilizaron los cebadores de PCR P1 y P4
para secuenciar, así como los cebadores del gel S1
10 interno conservado según fue necesario para completar la
secuenciación. Las secuencias de cebador utilizadas para
secuenciación están disponibles a solicitud.
Adicionalmente, los productos purificados con gel se
clonaron en un plásmido pCR2TOPO (Invitrogen) y se
15 transformaron en *E. coli* según las recomendaciones del
fabricante. Se identificaron varios clones de cada
aislado que contenía plásmidos con el inserto de 1.1 kb
mediante PCR utilizando los cebadores directos e inversos
M13. Se expandieron los clones y el plásmido purificado
20 mediante un kit de minipreparación de plásmidos (Qiagen,
Valencia, CA) de acuerdo con los métodos del fabricante.
Se utilizaron para secuenciación los cebadores directos e
inversos universales M13 junto con los cebadores de S1
internos según fue necesario para completar la
25 secuenciación. Se secuenciaron al menos tres clones de
productos de PCR de tres amplificaciones que contenían el
gen S1 en ambas direcciones y se utilizaron para obtener
el consenso. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos
de los aislados 94594, 94826 y 96139 se identifican en
30 las Figuras 1-6.

Análisis de secuencias. Se realizaron análisis de secuencias de nucleótidos y aminoácidos previstas y múltiples alineaciones del gen S1 y la proteína sigma C mediante CLUSTAL W (Lasergene, v. 5.0, DNASTAR, Madison, WI). Las secuencias para los genes S1 de reovirus aviares publicados anteriormente se obtuvieron de GenBank.

Se compararon las secuencias alineadas y se generó un árbol filogenético mediante agrupamiento Neighbor-Joining y 1000 replicados de análisis de remuestreo (los niveles de confianza se indican entre paréntesis) en una búsqueda heurística usando el software Phylogenetic Analysis Using Parsimony v 4.10b (PAUP).

Número de Acceso de GenBank. Las secuencias obtenidas para los aislados de pollo 94594, 94826 y 96139 se presentaron en GenBank y se les asignaron los siguientes números de acceso: KJ803966, KJ803967 y KJ803990, respectivamente.

Resultados y análisis

Hasta la fecha, han emergido dos variantes de genotipo primarias de aislados de campo del reovirus de casos clínicos de AV/tenosinovitis y se caracterizan como variantes de genotipos debido a la falta de similitud con las cepas de vacunas actuales contra el reovirus (S1133, 1733, 2408, 2177) y otros virus en las bases de datos (Figura 7). La mayoría de los aislados de campo pertenecen al grupo 1 (identificados como variantes de AV 2012 del grupo 1). Las secuencias de aminoácidos de sigma C de reovirus que pertenecen a este genotipo son >99% similares entre sí y <50% similares a cepas de vacunas cuando se comparan con secuencias en el dominio público y

la base de datos de PDRC (Figura 8). Los reovirus en el grupo 2 (identificados como variantes de AV 2012 del grupo 2) son > 99% similares entre sí y <50% similares a las variantes de AV 2012 del grupo 1 (Figura 8). La similitud de sigma C entre las variantes de AV 2012 del grupo 2 y las cepas de vacuna es 80% (Figura 8). A pesar de que este grupo comparte una similitud de secuencia más alta, no fue claro si el 80% de similitud se traduciría en algún nivel de protección cruzada con cepas de vacunas actuales. Se llevó a cabo una evaluación serológica de aislados de campo de ambos grupos con el fin de proporcionar información necesaria sobre la relación serológica de los virus.

Los virus representativos de variantes del grupo 1 y 2 se evaluaron en un ensayo de neutralización de una vía utilizando antisueros para S1133, 2408 y un suero hiperinmune preparado contra una variante de AV 2012 del grupo 1. Las titulaciones de VN entre los aislados de campo y el panel de suero estuvieron entre 2 y 16 y prueban que los aislados de campo no están serológicamente relacionados con S1133, 2408 ni entre sí.

Ejemplo 2

Estudios de patogenicidad y protección de progenie para la variante del reovirus del grupo 1

Este ejemplo determinó la patogenicidad de los aislados 94826 y 94594 de la variante del reovirus de AV 2012 del grupo 1 en pollos.

Experimento No. 1

Este experimento consistió en determinar si el programa de vacunación de reproductoras de la Compañía A

proporciona una protección adecuada contra el aislado de AV 2012 del grupo 1 en progenie desafiada con el aislado de campo de reovirus 94826.

Pollos. Se utilizaron 80 pollos de engorde de un día de edad de reproductoras vacunadas de la Compañía A.

Cant. de pollos	D del grupo	Grupo de tratamiento
20 pollos		Desangrados para ELISA de Reovirus (IDEXX)
20 pollos		Inoculados con S1133
20 pollos		Inoculados con el aislado 94826
20 pollos		Inoculados con PBS estéril

Tabla 1. Grupos de tratamiento

Virus. Se propagó y tituló el aislado de campo 94826 en células hepáticas de embriones de pollos primarios y se utilizó para inoculación del almohadilla plantar de pollos de un día de edad a una dosis de desafío de 10^3 TCID₅₀/ave. Se utilizará concentrado de S1133 también titulado en células hepáticas de embriones de pollos primarios para inoculación de la almohadilla plantar de pollos de un día de edad a una dosis de 10^3 TCID₅₀/ave. Los testigos negativos se someterán a un desafío simulado a través de la almohadilla plantar con PBS estéril.

Desafío de reovirus. Se recibieron sesenta aves de engorde comerciales el día de la eclosión y se dividieron en 3 grupos de 20 y se colocaron en unidades de aislamiento Horsfall Bauer. Los pollos del grupo 1 se

desangraron para ELISA de reovirus (IDEXX) y se sacrificaron. Los pollos de los Grupos 2-4 se inocularon a través de la almohadilla plantar con 1) PBS estéril, 2) S1133 o 3) 94826. Esto se detalla en la Tabla 1. Se observaron las aves a diario y se midió la hinchazón del corvejón con calibres digitales en cada grupo de tratamiento y se registró cada 2 días. El día 14, se sacrificaron todas las aves, se pesaron y se les realizó la necropsia. Las aves fueron examinadas en busca de lesiones macroscópicas y se examinaron las articulaciones de corvejones en busca de hinchazón, hemorragia y/o ruptura. Los parámetros para protección incluyeron serología el día de la eclosión, signos clínicos, mortalidad, peso corporal, lesiones macroscópicas y evaluación/medición de la hinchazón del corvejón a lo largo del estudio.

Experimento No. 2

Este experimento se realizó para determinar si el programa de vacunación de reproductoras de la Compañía B proporciona protección adecuada contra la artritis viral en progenie desafiada con un aislado reciente de campo de reovirus de la granja de la Compañía B y si utilizar o no una vacuna comercial contra el reovirus al día de edad proporciona protección.

Pollos. Se utilizaron 100 pollos de engorde de un día de edad de reproductoras vacunadas de la Compañía B.

Tabla 2. Grupos de tratamiento

5

10

Cant. de pollos	D del grupo	Grupo de tratamiento
20 pollos		Desangrados para ELISA de Reovirus (IDEXX)
20 pollos		Inoculados con PBS estéril
20 pollos		Dosis completa de VA ChickVac el día 1 y luego desafío con 94594
20 pollos		½ dosis de VA ChickVac el día 1 y luego desafío con 94594
20 pollos		Desafío con el aislado de campo 94594 de Sanderson

15

20

Virus. El aislado de campo de reovirus 94594 se propagó y tituló en células hepáticas de embriones de pollos primarios antes del estudio. Se utilizó VA ChickVac (Zoetis) para la vacunación del día de la eclosión según las recomendaciones del fabricante. Los testigos negativos se sometieron a desafío simulado con PBS estéril.

25

30

Desafío de reovirus. Se recibieron cien pollos comerciales el día de la eclosión y se dividieron en 5 grupos iguales de 20 pollos cada uno. El grupo 1 se desangró para ELISA de reovirus (IDEXX). Los 4 grupos restantes se colocaron en unidades de aislamiento Hosfall Bauer bajo presión positiva de aire forzado. El día de la eclosión se vacunó el grupo 3 con VA ChickVac a una dosis completa mediante administración subcutánea, mientras que el Grupo 4 se vacunó con VA ChickVac a media dosis mediante administración subcutánea. Esto se detalla en la

Tabla 2. El día 10, se obtuvieron las mediciones de las almohadillas plantares para todos los pollos. El día 10, se inoculó el grupo 2 a través de la almohadilla plantar con 0.1ml de solución salina tamponada con fosfato estéril, mientras que los pollos en los Grupos 3-5 se desafiaron mediante inoculación de la almohadilla plantar con aislado de campo 94594 a 10^3 TCID₅₀ por ave. Las aves se monitorearon a diario y se obtuvieron mediciones de los corvejones cada 2 días comenzando a los 10 días de edad. A los 22 días de edad, el estudio culminó. Los parámetros utilizados para la protección fueron la serología el día de la eclosión, los signos clínicos, la mortalidad, el peso corporal y las lesiones macroscópicas.

Resultados y análisis

Se llevaron a cabo estudios de patogenicidad y progenie en aves de engorde comerciales utilizando cepas representativas de la variante de genotipo de AV 2012 del grupo 1. En el primer estudio, se desafió a los pollos el día de la eclosión a través de la almohadilla plantar con S1133 o un aislado de la variante de AV 2012 del grupo 1 y se colocó un grupo para testigos negativos. Adicionalmente, se desangró un grupo separado de veinte pollos el día de la eclosión para ELISA de reovirus. Se colocaron todas las aves en corrales de piso en jaulas de aislamiento separadas con virutas nuevas y con acceso libre a comida y agua. Las mediciones de las almohadillas plantares se tomaron cada 2 días y las aves se monitorearon a diario en busca de signos clínicos hasta que finalizó el experimento el día 14 (Figura 9). La

media geométrica del título (GMT) de ELISA de Reovirus para el grupo fue 1,212, que se considera baja para pollos en el día de la eclosión. Se observó tenosinovitis clínica y supresión considerable del peso corporal tanto en S1133 como en grupos desafiados con la variante de reovirus (Figuras 10 y 12). Mientras que los pollos con S1133 se vieron más gravemente afectados por la cojera que aquellos desafiados con la variante, hubo una incidencia más alta de hinchazón alrededor del tendón flexor digital en el grupo desafiado con la variante (Figura 11). Otros signos clínicos observados en los grupos desafiados incluyeron hidropericardio e inflamación del corvejón (Figura 12). Las titulaciones de reovirus del día de la eclosión fueron bajas y, por lo tanto, los anticuerpos derivados maternos del programa de vacunación de la Compañía A no proporcionaron suficiente protección contra el desafío con las variantes del Grupo 1. Adicionalmente, el aislado de campo reprodujo la enfermedad clínica observada en el campo y se confirmó como el agente causante de la enfermedad.

En el segundo estudio, se desafiaron pollos de engorde comerciales con una variante del Grupo 1 a los 12 días de edad a través de la almohadilla plantar y el estudio finalizó a los 23 días de edad. La GMT de ELISA de reovirus obtenida de suero recolectado el día de la eclosión fue 4,900. En este estudio, los pesos corporales medios solamente fueron levemente más bajos en el grupo desafiado en comparación con los testigos negativos (Figura 13). Sin embargo, el grupo desafiado mostró signos clínicos y lesiones macroscópicas características

de artritis viral/tenosinovitis (Figura 14). Al igual que en el primer estudio, se observó hinchazón alrededor del tendón flexor digital, así como hidropericardio en las aves desafiadas (Figuras 12 y 13). A partir de este estudio, se puede concluir que los pollos con niveles más altos de anticuerpos de reovirus derivados materiales no estaban protegidos contra el desafío con la variante del grupo 1.

Adicionalmente, se evaluó el uso de la vacuna contra el reovirus comercial administrada por vía subcutánea a una dosis completa y media dosis el día de la eclosión a aves de engorde comerciales con posterior desafío con una variante del Grupo 1 a los 12 días de edad. Mediante los mismos parámetros que en los estudios anteriores, observamos signos clínicos y lesiones macroscópicas características de AV/tenosinovitis en todos los grupos desafiados. Como dato interesante, la incidencia de hidropericardio y corvejones hinchados fue más alta en los grupos que se vacunaron y desafiaron, sin importar la dosis, en comparación con el grupo de solo desafío (Figura 14).

En resumen, se han aislado variantes de reovirus de casos clínicos de artritis viral/tenosinovitis y son genética y antigénicamente distintas a las cepas de vacunas de reovirus actuales. Se identificaron dos grupos distintos como reovirus de AV de variante 2012 del Grupo 1 y Grupo 2 en base a la caracterización genética y serológica. Los estudios *in vivo* sugieren que las vacunas comerciales actuales no proporcionan protección contra el desafío con las

variantes 2012 del Grupo 1 en pollos con anticuerpos contra reovirus derivados maternos. A continuación, en el Ejemplo 3, se describen estudios *in vivo* con un aislado representativo del Grupo 2. Los reovirus de las variantes del Grupo 1 y 2 se han aislado o detectado para casos clínicos de tenosinovitis de numerosos estados dentro de los Estados Unidos y Canadá, siendo el número de aislados que pertenecen al Grupo 1 superior al del Grupo 2. No se conoce el origen de estos virus.

Ejemplo 3

Estudios de patogenicidad para la variante de reovirus del Grupo 2

Los procedimientos descritos en más detalle en el Ejemplo 2 se utilizaron para caracterizar la patogenicidad de una variante de reovirus del Grupo 2 en aves de engorde comerciales. Se utilizó una cepa representativa de la variante de genotipo de AV 2012 del Grupo 2 (Ck/96139 Tendón/GA/2012). Los grupos de tratamiento son como se describe en la Tabla 3.

Tabla 3. Grupos de tratamiento

Grupos	Tratamiento
10 aves de engorde comerciales de 1 día de edad	Desangradas para ELISA de Reovirus (IDEXX)
10 aves de engorde comerciales de 1 día de edad	Inoculadas con la Variante del Grupo 2
10 aves de engorde comerciales de 1 día de edad	Inoculadas con PBS estéril

Los pollos se inocularon a través de la almohadilla plantar con 0.1 ml de solución salina

tamponada con fosfato estéril o aislado de campo 996139 a 10^3 TCID₅₀ por ave. Los parámetros utilizados para protección fueron la serología el día de la eclosión, los signos clínicos, la mortalidad, el peso corporal y las lesiones macroscópicas. Se evaluó y se midió la hinchazón de la almohadilla plantar y la hinchazón de los tendones a lo largo de todo el estudio.

Resultados y análisis

La serología del día de la eclosión por ELISA de Reovirus (IDEXX) se muestra en la Figura 17. Específicamente, la media es 511, la GMT es 385, la DE es 343 y el CV% es 66.8%.

Tal como se muestra en la Figura 18, el desafío con el Grupo 2 reduce el peso corporal. Específicamente, se observó una supresión del peso corporal de 8% en las aves desafiadas con el Grupo 2.

La Figura 19 muestra las mediciones del día 14 de la hinchazón de la almohadilla plantar como un porcentaje del peso corporal, mientras que la Figura 20 muestra mediciones de tendinitis como un porcentaje del peso corporal para aves desafiadas con el Grupo 2.

La necropsia y los hallazgos histológicos para las aves desafiadas con el Grupo 2 son las siguientes: 2/10 aves con tendones rotos; 5/10 aves con tenosinovitis linfocítica (vaina del tendón); 2/10 aves con hidropericardio; y 2/10 aves con epicarditis linfocítica y miocarditis. No se observaron lesiones considerables en el hígado o duodeno.

De esta forma, el desafío con el Grupo 2 resultó en una supresión leve del peso. Se observó

hidropericardio, tendones hinchados y unos pocos tendones rotos en las aves desafiadas con el Grupo 2. Asimismo, se observaron lesiones histológicas consistentes con reovirus en el corazón y los tendones.

5 En conclusión, tanto las variantes del Grupo 1 como las del Grupo 2 se aíslan a partir de casos clínicos de artritis viral en aves de engorde comerciales. Tanto las variantes del Grupo 1 como las del Grupo 2 reproducen
10 tenosinovitis, incluido hidropericardio e hinchazón de tendones observados macroscópicamente y se observaron cambios histológicos consistentes con reovirus en corazones y tendones. Las variantes del Grupo 1 son más prevalentes. Las vacunas comerciales actuales no parecen proporcionar una protección adecuada en aves de engorde.
15 De esta forma, una vacuna autógena parece ser la única opción para el control.

Ejemplo 4

Ensayo de placa para reovirus aviar

20 Siembra de células hepáticas de embriones de pollo en placas de 35 mm:

-El día anterior a realizar el ensayo, agregar Células Hepáticas de Embriones de Pollos (CELiC) en 35 placas de petri (2 ml/placa de petri).

25 -Colocar las placas de 35 mm en la incubadora a 37°C (durante la noche, al menos más de 12 horas).

Procedimiento para el ensayo de las placas:

-Retirar el medio (M199/F10+10% de FBS) de las CELiC confluentes.

30 -Agregar 200 µl del virus (10^2 TCID₅₀) a la placa.

-Treinta minutos después, agregar 2 ml de M199/F10+2% de CS con virus diluido a la placa y agitar suavemente la placa.

-Incubar la placa durante 3-4 horas a 37°C.

5 -Durante ese tiempo, preparar 2 ml por placa: 1 ml (2x de concentración de M199/F10 +5% de CS) + y 1 ml de 3% de Agarosa SeaPlaque en H₂O con grado de cultivo celular.

10 -Después de 3-4 horas, sacar la placa de la incubadora y retirar el sobrenadante (1,200 µl).

-Ahora, 2 ml/ pocillo de la transparencia preparada, e incubar durante 2-3 días a 37°C.

15 Tinción después de 2-3 días (Generalmente intentar teñir 2 días después de la inoculación, si pasan más de 3 días las células empezarán a morir y las placas pueden no estar bien):

-Preparar 10% de rojo Neutral filtrado diluido en agua con grado de cultivo celular.

-Agregar 1 ml/placa.

20 -Incubar durante al menos 2 horas (2- 4 horas) en la incubadora.

-Después de un par de horas, las placas parecerán claras.

25 Resultados: Las células vivas se teñirán de rojo. Las placas permanecerán sin teñirse.

Ejemplo 5

Secuencias de proteína sigma C del Grupo I y el Grupo 2

30 Siguiendo los procedimientos descriptos en más detalle en el Ejemplo 1, se determinaron las secuencias

de nucleótidos que codifican la proteína sigma C y las secuencias de aminoácidos de sigma C codificadas de 122 variantes de reovirus aviáres del Grupo 1 y el Grupo 2. La Figura 21 muestra el Número de Acceso de GenBank, ID de secuencia, designación del aislado, tipo de tejido del que se aislaron los virus, fecha de recolección, estado y país de aislamiento y fuente de aislamiento para los 122 aislados. Las células hepáticas de embriones de pollo sirven como huésped de laboratorio para los 122 aislados.

Ejemplo 5

Atenuación de variantes de reovirus aviáres del Grupo I y el Grupo 2

Los aislados de reovirus aviar del Grupo I y el Grupo 2 enumerados en la Figura 21 incluidos, a modo no taxativo, los aislados 94826 y 94594 (ambos aislados del Grupo 1) y el aislado 96139 (un aislado del Grupo 2), se atenuarán mediante pase en huevos o líneas celulares, tales como por ejemplo, células hepáticas de embriones de pollos (CELiC). Se realizará una preparación del virus purificada con placas y clonal después de cada pase y se utilizará para la siguiente ronda de atenuación. Se evaluará la patogenicidad y efectividad de la vacuna de un aislado después de cada 25 pases aproximadamente, por ejemplo, después de aproximadamente 25, aproximadamente 50, aproximadamente 75, aproximadamente 100 y aproximadamente 125 pases. La secuencia de aminoácidos de la proteína sigma C puede obtenerse para cepas atenuadas.

La divulgación completa de todas las patentes, solicitudes de patente y publicaciones, así como el material disponible por medios electrónicos (incluidas,

por ejemplo, presentaciones de secuencias de nucleótidos en, por ejemplo, GenBank y RefSeq, y presentaciones de secuencias de aminoácidos en, por ejemplo, SwissProt, PIR, PRF, PDB, y traducciones de regiones de codificación anotadas en GenBank y RefSeq) citadas en la presente se incorporan a la presente a modo de referencia. En caso de que exista incoherencia entre la divulgación de la presente solicitud y la divulgación de cualquier documento incorporado a la presente a modo de referencia, regirá la divulgación de la presente solicitud. La descripción detallada y los ejemplos precedentes se han proporcionado a efectos de claridad y comprensión únicamente. No deben comprenderse limitaciones innecesarias a partir de los mismos. La invención no está limitada a los detalles exactos que se muestran y se describen, dado que las variaciones evidentes para los expertos en la técnica se incluirán dentro de la invención definida en las reivindicaciones.

Listado libre de secuencias

SEQ ID NO:1

Secuencia de nucleótidos de S1 que codifica la proteína sigma C (pares de bases 1-931) del aislado de campo 94594 de la variante de AV 2012 del grupo 1

SEQ ID NO:2

Secuencia de aminoácidos de S1 de sigma C (aminoácidos 1-310) del aislado de campo 94594 de la variante de AV 2012 del grupo 1

SEQ ID NO:3

Secuencia de nucleótidos de S1 que codifica la proteína sigma C (pares de bases 1-931) del aislado de campo 94826 de la variante de AV 2012 del grupo 1

SEQ ID NO:4

5 Secuencia de aminoácidos de S1 de sigma C (aminoácidos 1-310) del aislado de campo 94826 de la variante de AV 2012 del grupo 1

SEQ ID NO:5

10 Secuencia de nucleótidos de S1 que codifica la proteína sigma C (pares de bases 1-931) del aislado de campo 96139 de la variante de AV 2012 del grupo 2

SEQ ID NO:6

15 Secuencia de aminoácidos de S1 de la proteína sigma C (aminoácidos 1-310) del aislado de campo 96139 de la variante de AV 2012 del grupo 2

SEQ ID NO:7 cebador de PCR P1

SEQ ID NO:8 cebador de PCR P4

20 Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.

25

30