

DESCRIPCIÓN

MÉTODO DE DETECCIÓN DE LA ENTERITIS NECRÓTICA AVIAR

La presente invención se refiere a un método basado en microvesículas para detectar la enteritis necrótica aviar, así como a nuevos marcadores que han sido identificados como adecuados para la detección de enteritis necrótica aviar y/o infección aviar que implica *Clostridium perfringens*.

El *Clostridium perfringens* es el principal agente causal de la enteritis necrótica aviar (EN), una enfermedad entérica de las aves de corral que se describió por primera vez en 1961. La EN en pollos se manifiesta como una enterotoxemia aguda o crónica. La enfermedad aguda produce niveles significativos de mortalidad debido al desarrollo de lesiones necróticas en la pared intestinal, mientras que la enfermedad crónica provoca una pérdida significativa de productividad y bienestar. Se ha estimado que la enfermedad da lugar a daños de varios miles de millones de dólares americanos por año para la industria avícola.

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

Los primeros estudios sobre EN sugirieron que el principal factor de virulencia involucrado en la enfermedad fue secretado por las bacterias, lo que llevó a la propuesta de que una enzima fosfolipasa C, llamada alfa-toxina, era la principal toxina involucrada en la patogénesis. Pero estudios recientes demostraron que la alfa-toxina no parece ser un factor de virulencia esencial ya que las cepas mutantes de toxina alfa eran capaces de causar EN, lo que cuestiona el papel de la alfa-toxina en la enfermedad en general. En estudios más recientes, se ha sugerido que el nuevo poro que forma la toxina, netB, desempeña un papel clave importante en el desarrollo de esta enfermedad.

Aparte de la mera asociación de los factores de virulencia de por sí con la incidencia de EN, todavía existe una gran carga para mostrar el vínculo mecanicista entre estos factores para el establecimiento de la enfermedad en aves o animales de granja. Además, relacionar la infección subclínica de EN con cualquiera de estos factores de virulencia es extremadamente difícil de conseguir ya que las aves están ausentes de signos para justificar su examen antes del sacrificio. Por lo tanto, sigue siendo imperativa la necesidad de un método temprano de detección de EN, y lo más importante, las formas subclínicas de EN.

Tradicionalmente, el descubrimiento y validación de biomarcadores para la enfermedad requiere el uso de tejido, ya sea fresco congelado, o más comúnmente, fijado en formol, embebido en parafina. Esto ha sido especialmente cierto para los biomarcadores basados en mRNA, porque la degradación de ARNasa libre de ARN hace que la traducción de biomarcadores basados en tejidos en biofluidos tales como muestras de sangre o fecales/cecales sea altamente problemática. Sin embargo, el monitoreo de los biomarcadores tisulares es así, debido a su naturaleza invasiva, demorada e impráctica, cuando se trata de un gran número de muestras como en el caso de los animales de granja.

Se han descrito métodos no invasivos tales como la medición de parámetros sanguíneos para la detección de enfermedades en 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 fase aguda como la ceruplasmina, PIT54 y ovotransferrina en respuesta al desafío de *C. perfringens* en el suero sanguíneo de los pollos.

Resultó que solo la ceruplasmina parecía ser una proteína de fase aguda adecuada que se correlacionaba con la ocurrencia de EN subclínica. No obstante, esto puede verse como un problema, ya que la ceruplasmina no es un marcador específico para EN, sino para enfermedades causadas por otros patógenos bacterianos (Collibacillosis en pollos, Piercy, 1979, Salmonella en capas comerciales, Garcia et al., 2009) así como.

Sin embargo, recientemente se descubrió que los exosomas y otras vesículas de membrana que se encuentran en los biomateriales contienen ARN estable de células donantes humanas, incluyendo ARNm, miARN y otros ARN no codificantes con alta especificidad a las enfermedades (Skog et al., 2008; 2009, Li et al., 2009, Shao et al., 2012).

Así, los inventores de la presente solicitud se preguntaron si las vesículas de membrana aisladas de fluidos corporales o excrementos de aves de corral podrían ser utilizadas para determinar aves de corral que presentan enteritis necrótica subclínica. Esto podría ser en particularmente cierto debido a una acumulación de miARN específico hospedador mostrando correlación con la enfermedad.

Sorprendentemente se encontró que las microvesículas aisladas de fluidos corporales aviares o excrementos de aves presentaban una alteración en el contenido de ARN detectable en dependencia de la presencia de enteritis necrótica. Además de un aumento de miARN específico en las microvesículas debido a la infección por *C. perfringens*, sorprendentemente también se pudieron detectar secuencias de ARNm de *C. perfringens* en la fracción de microvesícula, que por lo tanto se clasifican como factores de virulencia específicos de la enfermedad y, en consecuencia, como biomarcadores adecuados indicativos de enteritis necrótica.

La aparición de ARNm de *C. perfringens* en la fracción de microvesícula puede explicarse por el hecho de que el procedimiento de aislamiento aplicado no sólo conduce a un enriquecimiento de microvesículas de aves de corral, sino también a un enriquecimiento de microvesículas de la bacteria infecciosa. Sorprendentemente, además de factores conocidos de virulencia putativo como netB, también podrían identificarse secuencias de ARN no sospechosas como siendo correlativas a enteritis necrótica.

Por lo tanto, un primer objeto de la presente invención es proporcionar un método rápido y fiable, preferiblemente no invasivo, para determinar la enteritis necrótica aviar, particularmente la enteritis necrótica subclínica aviar, preferentemente en aves de corral, más preferentemente en pollo y/o para identificar sujetos aviares que padecen enteritis necrótica.

Otro objeto de la presente invención era identificar marcadores adecuados, preferiblemente marcadores específicos de la enfermedad, que se pueden emplear en tal método.

De este modo, un primer objeto de la presente invención es un método para detectar la enteritis necrótica aviar, en particular la enteritis necrótica aviar subclínica, comprendiendo el método aislar microvesículas de una muestra aviar, en particular de un fluido 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 nivel aumentado de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de enteritis necrótica.

El marcador indicativo para la enteritis necrótica de acuerdo con la invención se selecciona preferiblemente de las siguientes secuencias de *Clostridium perfringens* y homólogos y fragmentos de la misma: la región de SAM (SEQ ID NO: 1), la región de dedo de zinc swim (SEQ ID NO: 3), el scRNA (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 y homólogos aviares y

sus fragmentos: Mir-16 (SEQ ID NO: 10), mir-24 (SEQ ID NO: 11), mir-155 (SEQ ID NO: 12), mir-206 (SEQ ID NO: 13).

5 Por lo tanto, un objeto preferido de la presente invención es un método para detectar enteritis
necrótica aviar, particularmente la enteritis necrótica aviar subclínica, comprendiendo el
método aislar microvesículas de una muestra aviar, en particular de fluidos 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 nivel aumentado 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
10 ("Lista I"):

a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente
al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos
consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 1;

15 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente
al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos
consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 3;

20 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente
al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos
consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 4;

d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente
al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
25 menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos
consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 5;

e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente
al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
30 menos 10, preferiblemente 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%, preferiblemente al
menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos
10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos
de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 8;

35 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente
al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos
consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 9;

40 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente
al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos
consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 16;

i) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al
menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos

- 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40, 60 u 80, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 10;
- 5 j) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 11;
- 10 k) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 12;
- l) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 13;
- 15 m) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a) a (l);
- n) polinucleótidos (DNAs y RNAs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (m);
- o) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (n).
- 20 En este método, las secuencias se seleccionan preferiblemente del siguiente grupo ("Lista II"):
- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferiblemente 460 a 560, de SEQ ID NO: 1,
- 25 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 600 a 1000, en particular 670 a 760, de la SEQ ID NO: 3,
- 30 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 60 a 240, en particular 80 a 220, de la SEQ ID NO: 4;
- 35 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de acuerdo con la posición 1300 a 1800, en particular 1400 a 1700, de (la secuencia como se representa en) SEQ ID NO: 5;
- 40 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos

consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 1 a 591, en particular 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;

5 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 240 a 540, en particular 300 a 540 de SEQ ID NO: 8;

10 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 12 a 418, en particular 240 a 400, de la SEQ ID NO: 9;

15 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 673 a 5628 de SEQ ID NO: 16;

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

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

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

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

35 m) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a) a (l);

n) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (m);

o) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (n).

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

40 a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 30 o 40 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 460 a 560 de la SEQ ID NO: 1,

- b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 30 o 40 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 670 a 760 de la SEQ ID NO: 3,
- 5 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 30 o 40 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 80 a 220 de SEQ ID NO: 4;
- 10 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 30 o 40 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 1400 a 1700 de SEQ ID NO: 5;
- 15 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 30 o 40 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;
- 20 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 30 o 40 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 300 a 540 de SEQ ID NO: 8;
- g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 30 o 40 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 240 a 400 de SEQ ID NO: 9;
- 25 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 30 o 40 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 673 a 5628 de SEQ ID NO: 16;
- 30 i) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 14 a 25 de la SEQ ID NO: 10;
- 35 j) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 44 a 65 de la SEQ ID NO: 11;
- 40 k) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 3 a 24 de SEQ ID NO: 12;
- l) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 45 a 66 de SEQ ID NO: 13,

m) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a) a (l);

n) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (m);

5 o) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (n).

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

10 Otro objeto de la presente invención es un método de detección de *Clostridium perfringens* asociado a una infección asociada, particularmente a la enteritis necrótica por *Clostridium perfringens*, el método que comprende aislar microvesículas de una muestra de aves y determinar posteriormente la presencia y/o el nivel de al menos un marcador indicativo de la presencia de infección asociada, en particular de enteritis necrótica asociada, *Clostridium perfringens* en estas microvesículas, en donde la presencia y/o un nivel aumentado de este al
15 menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de la enfermedad, en particular la enteritis necrótica. En este método, el al menos un marcador se selecciona preferiblemente de los polinucleótidos de la Lista I, (a) a (h), así como de polinucleótidos (ADNs y ARNs) complementarios a esas secuencias. Más preferiblemente, el marcador se selecciona entre los polinucleótidos de la Lista II, (a) a (h), así como de
20 polinucleótidos (ADNs y ARNs) complementarios de esas secuencias. Aún más preferiblemente, el marcador se selecciona entre los polinucleótidos de la Lista III, (a) a (h), así como de polinucleótidos (ADNs y ARNs) complementarios a dichas secuencias.

Otro objeto de la presente invención es un método para detectar miARN aviar asociado a una enteritis necrótica, el método que comprende aislar microvesículas de una muestra aviar y
25 determinar posteriormente la presencia y/o el nivel de infección asociado, en particular la enteritis necrótica asociada, miARN en estas microvesículas, en donde la presencia y/o un nivel aumentado de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de la enfermedad, en particular la enteritis necrótica. En este método, el al menos
30 un marcador se selecciona preferiblemente de los polinucleótidos de la Lista I, (i) a (1), así como de polinucleótidos (ADNs y ARNs) complementarios a esas secuencias. Más preferiblemente, el marcador se selecciona entre los polinucleótidos de la Lista II, (i) a (1), así como de polinucleótidos (ADNs y ARNs) complementarios a esas secuencias. Aún más preferiblemente, el marcador se selecciona entre los polinucleótidos de la Lista III, (i) a (1), así como de polinucleótidos (ADNs y ARNs) complementarios a esas secuencias.

35 Como es sorprendente que la región SAM (SEQ ID NO: 1), la región de dedo de zinc swim (SEQ ID NO: 3), el scRNA (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) pueden usarse como marcadores para determinar la enteritis necrótica aviar, otro objeto de la presente invención es un método para detectar la
40 enteritis necrótica aviar, en particular la enteritis necrótica aviar subclínica, en donde la detección de 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, en particular en comparación con una muestra de control de una ave no infectada, en donde la presencia y/o un nivel aumentado de al menos una de esas secuencias en comparación con un control no
45 infectado es indicativo de enteritis necrótica:

a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al

- menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 1,
- 5 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 3,
- 10 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente 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%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 7;
- 15 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 9;
- 20 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40, 60 o 80, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 10;
- 25 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 11;
- 30 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 12;
- i) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 ó 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 13;
- 35 j) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a) a (i);
- k) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (j);
- l) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (k).
- 40 En este método, las secuencias se seleccionan preferiblemente del siguiente grupo ("Lista V"):
- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al

- menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferiblemente 460 a 560, de la SEQ ID NO: 1,
- 5 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente 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,
- 10 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 60 a 240, en particular 80 a 220, de la SEQ ID NO: 4;
- 15 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 1 a 591, en particular 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;
- 20 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 12 a 418, en particular 240 a 400 de SEQ ID NO: 9;
- 25 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las posiciones 14 a 25 de la SEQ ID NO: 10;
- 30 g) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las posiciones 44 a 65 de SEQ ID NO: 11;
- 35 h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las posiciones 3 a 24 de SEQ ID NO: 12;
- i) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 ó 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 45 a 66 de SEQ ID NO: 13,
- 40 j) polinucleótidos (ADNs y ARN) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a) a (i);
- k) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (j);
- l) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (k).

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

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

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

5 La muestra aviar de acuerdo con la invención puede ser una muestra de tejido, preferiblemente una muestra intestinal, particularmente una muestra duodenal o una yeyunal.

Preferiblemente, la muestra aviar se selecciona de fluidos corporales aviares y excrementos aviares y soluciones y suspensiones de los mismos.

El fluido corporal aviar de acuerdo con la invención es preferiblemente sangre, suero sanguíneo o plasma sanguíneo.

10 El excremento aviar de acuerdo con la invención se selecciona preferiblemente de excrementos fecales y cecales.

Los volúmenes de muestra adecuados son, por ejemplo, de 0.1 a 20 ml, en particular de 0.2 a 10 ml, preferiblemente de 0.5 a 5 ml. Las masas de muestra adecuadas son, por ejemplo, de 0.1 a 20 g, en particular, de 0.2 a 10 g, preferiblemente de 0.5 a 5 g.

15 El sujeto aviar de acuerdo con la invención es preferiblemente ave de corral.

Las aves de corral preferidas de acuerdo con la invención son pollos, pavos, patos y gansos. Las aves de corral se pueden optimizar para la producción de cría. Este tipo de aves de corral también se conoce como los animales progenitores. Los animales progenitores preferidos son, en consecuencia, pollos de engorde parentales, patos parientes, pavos de origen y gansos progenitores.

Las aves de corral de acuerdo con la invención también se pueden seleccionar de aves de corral de lujo y aves silvestres.

Las aves de corral preferidas o las aves silvestres son pavos reales, faisanes, perdices, pintadas, codornices, urogallos, urogallos, palomas y cisnes.

25 Otras aves de corral preferidas de acuerdo con la invención son avestruces y loros.

Las aves de corral más preferidas según la invención son pollos.

Tal como se usa en la presente memoria, el término "polinucleótidos" o "ácidos nucleicos" se refiere a ADN y ARN. Los polinucleótidos y ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios.

30 El aislamiento de las microvesículas de los excrementos aviares y su posterior uso para determinar una infección aviar, en particular la infección bacteriana aviar, una enteritis necrótica más particularmente, no se ha descrito previamente.

Por lo tanto, otro objeto de la presente invención es un método para detectar una infección aviar, en particular una infección aviar subclínica, preferiblemente una infección bacteriana aviar, en particular una infección bacteriana subclínica aviar, más preferiblemente una enteritis necrótica, en particular una 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 aviares, en particular a partir de excrementos fecales o cecales, en donde la presencia y/o un nivel aumentado de este al menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de la enfermedad. En este método, al menos un marcador se selecciona preferiblemente entre cualquiera de los

polinucleótidos como se describe en la Lista I, preferiblemente como se describe en la Lista II, más preferiblemente como se describe en la Lista III.

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.

Por lo tanto, se encontró que en los excrementos fecales el mejor marcador es la región SAM, seguida por scRNA, la región netB, la región virX, la región colA, la región del dedo de zinc swim y la región CPE0956.

Por el contrario, en los excrementos cecales el mejor marcador es también la región SAM, pero es seguida por la región del dedo de zinc swim, scRNA, mir206, la región virX, la región netB, la región CPE0956 y la región colA.

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

Por lo tanto, una realización preferida de la presente solicitud es un método para detectar enteritis necrótica aviar, en particular la enteritis necrótica aviar subclínica, el método comprende determinar la presencia y/o el nivel de al menos un marcador indicativo de enteritis necrótica en excrementos fecales aviares, preferiblemente en microvesículas aisladas de excrementos fecales aviares, en donde la presencia y/o un nivel aumentado 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 preferiblemente de

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

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

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

d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 5;

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

f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente 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%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 9;
- 5 h) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a) a (g);
- i) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (h);
- j) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (i).
- 10 En este método, las secuencias se seleccionan preferiblemente del siguiente grupo:
- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60 o 100, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferiblemente 460 a 560, de SEQ ID NO: 1,
- 15 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60 o 90, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 600 a 1000, en particular 670 a 760, de la SEQ ID NO: 3,
- 20 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100 o 140, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 60 a 240, en particular 80 a 220, de la SEQ ID NO: 4;
- 25 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de acuerdo con la posición 1300 a 1800, en particular 1400 a 1700, de SEQ ID NO: 5;
- 30 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150 o 180, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con 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%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, Preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las posiciones 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%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150 o 160, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 12 a 418, en particular 240 a 400 de SEQ ID NO: 9;

h) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a) a (g);

i) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (h);

5 j) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (i).

Por lo tanto, otra realización preferida de la presente solicitud es un método para detectar la enteritis necrótica aviar, particularmente la enteritis necrótica aviar subclínica, el método comprende 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
10 excrementos cecales aviares, en donde la presencia y/o un nivel aumentado 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 preferiblemente de

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

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

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

25 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 5;

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

f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos
35 20, preferiblemente 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%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
40 menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 9;

h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente 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 de acuerdo con (a) a (h);

j) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (i);

5 k) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (j).

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

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

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

c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100 o 140, nucleótidos consecutivos de la
20 secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 60 a 240, en particular 80 a 220, de la SEQ ID NO: 4;

d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos
25 de acuerdo con 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%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150 o 180, nucleótidos consecutivos de la
30 secuencia de nucleótidos de acuerdo con 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%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la
35 secuencia de nucleótidos de acuerdo con las posiciones 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%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150 o 160, nucleótidos consecutivos de la
40 secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 12 a 418, en particular 240 a 400 de SEQ ID NO: 9;

h) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente 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 de acuerdo con (a) a (h);
- j) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (i);
- 5 k) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (j).
- Por lo tanto, otra realización preferida de la presente solicitud es un método para detectar enteritis necrótica aviar, en particular enteritis necrótica subclínica, comprendiendo el método determinar la presencia y/o nivel de al menos un marcador indicativo de enteritis necrótica en sangre de ave, en particular en microvesículas aisladas de sangre de ave, en donde la
- 10 presencia y/o un nivel aumentado de este por lo menos un marcador en comparación con un control no infectado es indicativo de enteritis necrótica y en donde al menos un marcador se selecciona preferiblemente de
- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 ó 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
- 15 menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40, 60 u 80, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 10;
- b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
- 20 menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 11;
- c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
- 25 menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18, 20, 25, 40 o 60, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 12;
- d) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a) a (c);
- e) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (d);
- f) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (e).
- 30 En este método, las secuencias se seleccionan preferiblemente del siguiente grupo:
- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
- 35 menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12 nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las posiciones 14 a 25 de la SEQ ID NO: 10;
- b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
- 40 menos 8 ó 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las posiciones 44 a 65 de la SEQ ID NO: 11;
- c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al
- menos 8 o 10, preferiblemente al menos 12, 14, 16, 18 o 20, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con las posiciones 3 a 24 de SEQ ID NO: 12;

- d) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a) a (c);
- e) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (d);
- 5 f) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (e).
- Otro objeto de la presente invención es un método de tratamiento de enteritis necrótica que comprende realizar el método de detección de enteritis necrótica como se ha descrito antes y administrar posteriormente un agente terapéutico para el tratamiento de enteritis necrótica.
- 10 Otro objeto de la presente invención es también un conjunto de nucleótidos para detectar la enteritis necrótica aviar, en donde el conjunto de nucleótidos comprende al menos un marcador, preferiblemente al menos 2, 3, 4 o 5 marcadores, seleccionado de entre los polinucleótidos como se representa en la Lista IV, preferiblemente como se representa en la Lista V, más preferentemente como se representa en la Lista VI.
- 15 Otro objeto de la presente invención es también un kit que comprende un conjunto de oligonucleótidos para amplificar al menos un polinucleótido asociado con enteritis necrótica, en donde el al menos un polinucleótido se selecciona de los polinucleótidos como se representa en la Lista IV, preferiblemente como se representa en la Lista V, más preferentemente como se representa en la Lista VI.
- 20 NetB y TpeL ya han sido discutidos como las principales toxinas implicadas en la patogénesis de la enteritis necrótica (Keyburn et al, 2010; WO 2008/148166; Shojadoost et al., 2012)
- ColA significa Collagenase A de *Clostridium perfringens*; este gen podría estar asociado con la patogénesis de EN debido a su similitud con la denominada kappa-toxina, una de las toxinas principales de esta bacteria (Obana et al., 2013).
- 25 Sin embargo, la ocurrencia, así como la desregulación de estos genes en microvesículas no podría haber sido esperada.
- El gen virX es conocido por regular los genes plx, colA y pfoA en *C. perfringens* (Ohtani et al., 2002), pero su implicación en la patogénesis de NE no se ha informado antes.
- 30 El pequeño ARN citoplásmico (scRNA), miembro de una familia de ARN de tipo de partícula de reconocimiento de señales conservada evolutivamente, implicada en el mecanismo de esporulación de *Clostridium perfringens* (Nakamura et al., 1995) tampoco se ha informado previamente que estuviera en asociación directa con NE en pollos.
- Por otra parte, la participación del dominio SAM, el dominio de dedo de zinc swim y la región CPE0956 en la patogénesis de la enteritis necrótica no se ha descrito antes y tampoco podría esperarse ya que estas secuencias son secuencias con funciones previamente desconocidas.
- 35 Unos objetos adicionales de las invenciones actuales son por lo tanto polinucleótidos, que codifican preferiblemente un polipéptido con actividad de toxina y/o un factor de virulencia implicado en enteritis necrótica, seleccionado del grupo que consiste en
- 40 a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 100, preferiblemente al menos 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos como se representa en la SEQ ID NO: 1;

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

Son particularmente preferidos los polinucleótidos seleccionados del grupo que consiste en

- 25 a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 100, preferiblemente al menos 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferiblemente 460 a 560, de SEQ ID NO: 1;
- 30 b) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90%, preferiblemente al menos 95, 98 o 99%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 10, preferiblemente al menos 15, 20, 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 1 a 630, en particular 420 a 630, preferiblemente 460 a 560, de SEQ ID NO: 1;
- 35 c) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 100, preferiblemente al menos 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 600 a 1000, en particular 670 a 760, de la SEQ ID NO: 3;
- 40 d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90%, preferiblemente al menos 95, 98 o 99%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 600 a 1000, en particular 670 a 760, de SEQ ID NO: 3;

5 e) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 100, preferiblemente al menos 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 1 a 591, en particular 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;

10 f) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 90%, preferiblemente al menos 95, 98 o 99%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 20, preferiblemente al menos 25, 40, 60, 100, 150, 180 o 200, nucleótidos consecutivos de la secuencia de nucleótidos de acuerdo con la posición 1 a 591, en particular 100 a 280 de SEQ ID NO: 7;

g) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a) a (f);

h) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (g).

15 Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención son también polipéptidos, que son preferiblemente toxinas y/o factores de virulencia implicados en la enteritis necrótica, seleccionados del grupo que consiste en

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

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

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

d) polipéptidos que comprenden los polipéptidos de acuerdo con (a) a (c).

Son particularmente preferidos los polipéptidos seleccionados del grupo que consiste en

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

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

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

d) polipéptidos que comprenden los polipéptidos de acuerdo con (a) a (c).

Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención es también un método para aumentar una respuesta inmune en un animal; comprendiendo el método administrar al animal un polipéptido como se mencionó anteriormente, en particular seleccionado del grupo que consiste en

5

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

10

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

15

c) polipéptidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a 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 representada en la SEQ ID NO: 15;

20

d) polipéptidos que comprenden los polipéptidos de acuerdo con (a) a (c).

Los polipéptidos de acuerdo con la invención presentan preferiblemente actividad de toxina y son preferiblemente obtenibles de *Clostridium perfringens*. Más preferiblemente, los polipéptidos de acuerdo con la invención son factores de virulencia asociados a NE.

25

Otros objetos de la presente invención son vectores, particularmente en vectores de clonación y de expresión, así como vectores virales y plásmidos, que comprenden un polinucleótido de acuerdo con la invención.

Otro objeto de la presente invención son también células, particularmente células bacterianas, preferiblemente células de *E. coli*, que comprenden un polinucleótido, un polipéptido y/o un vector de acuerdo con la invención.

30

Otro objeto de la presente invención es un anticuerpo policlonal o monoclonal o un fragmento del mismo, que se une específicamente a un polipéptido con actividad de toxina de acuerdo con la invención, en particular factores de virulencia asociados a EN de acuerdo con la invención.

35

Otro objeto de la presente invención es una composición que comprende un polinucleótido, un polipéptido, un vector, una célula o un anticuerpo de acuerdo con la invención.

40

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

Otro objeto de la presente invención es una composición inmunogénica que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención y un adyuvante y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 5 Otro objeto de la presente invención es también una vacuna, que comprende un polipéptido de acuerdo con la invención y preferiblemente un adyuvante y/o un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Las microvesículas de acuerdo con la invención comprenden vesículas de membrana procedentes de bacterias, en particular *Clostridium perfringens*, así como del huésped, en particular pollo.

- 10 La versión eucariótica de las vesículas de membrana también se conoce como exosomas. Los exosomas tienen típicamente un diámetro de 30-200 nm. Se vierten en todos los biofluidos y llevan muchas proteínas intactas y oligonucleótidos, ya que están protegidos de la degradación por RNAses (Koga et al., 2011)

Los exosomas se han estudiado particularmente en cáncer y células inmunes.

- 15 Las microvesículas de bacterias también se denominan vesículas de membrana extracelular (MVs) o vesículas de membrana externa (OMVs). Son estructuras bicapa esféricas con un diámetro medio típicamente de 20-500 nm. Las microvesículas bacterianas se han descrito en primer lugar para las bacterias Gram-negativas, pero posteriormente también para algunas bacterias Gram-positivas. En un estudio reciente, se informó que las microvesículas son producidas y liberadas también por cepas de *C. perfringens* tipo A, provocando respuestas inmunes innatas y adaptativas. Se descubrió además en el curso de este estudio que no existían factores de virulencia importantes como la alfa-toxina y NetB en las vesículas de membrana, mientras que la beta2-toxina se encontró en las vesículas de membrana (Jiang et al., (2014).
- 20
- 25 MicroRNAs (miRNAs) son pequeños, no codificantes RNAs que son generalmente de 18-23 nucleótidos de tamaño y se ha sugerido que desempeñan un papel crítico en la regulación de la expresión génica. Particularmente, los genes asociados con las respuestas inmunes han sido reportados como altamente dirigidos por miRNAs. En pollos la expresión de miARN se ha estudiado en procesos de desarrollo embrionario, desarrollo de células germinales,
- 30 órganos inmunes y enfermedades.

- En estudios recientes se investigó el perfil de miARN de dos líneas de pollo White Leghorn altamente infectadas infectadas por *C. perfringens* (Dinh et al., 2014, Hong et al., 2014). El análisis de ARN se llevó a cabo con tejido de bazo y mucosa intestinal. Los resultados sugieren que algunos miRNAs son diferencialmente alterados en respuesta a la enteritis necrótica y que modulan la expresión de sus genes diana. Las microvesículas no fueron investigadas en estos estudios.
- 35

- Los miRNAs que se encontraron correlativos a la enteritis necrótica de acuerdo con la presente invención fueron investigados antes por Wang et al. En relación con pollos de engorde infectados con el virus de la influenza aviar (Wang et al., 2012). Wang et al. Encontró que los miRNAs miR-155, miR-16-1 y miR-24 se expresan más fuerte en los pulmones de pollos infectados que en los no infectados, pero encontraron que el miR-206 es, por el contrario, Más fuerte en los no infectados que en los infectados. Así, el uso de miR-206 como marcador para una infección bacteriana se describe en la presente solicitud por primera vez. Además, en contraste con Wang et al. De acuerdo con la presente invención, todos los miARN se detectaron en microvesículas, no en tejido.
- 40
- 45

Por lo tanto, un objeto adicional de la presente invención es un método para detectar una infección bacteriana aviar, particularmente la enteritis necrótica aviar, comprendiendo el procedimiento aislar microvesículas de una muestra de aves y determinar posteriormente el nivel de al menos un marcador aviar indicativo de la infección, en donde un nivel aumentado 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 preferiblemente del grupo que consiste en

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

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

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

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

e) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias según (a) a (d);

25 f) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (e);

g) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (f).

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

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

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

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

d) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente 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 (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias según (a) a (d);
- f) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (e);
- g) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) a (f).
- 5 Como mir-206 podría ser identificado por primera vez como marcador para infecciones aviarias, en todo caso, otro objeto de la presente invención es un método para detectar una infección aviar, preferiblemente una infección bacteriana aviar, más preferiblemente una enteritis necrótica aviar, en donde un nivel aumentado de al menos un marcador aviar en comparación con un control no infectado es indicativo de la infección y en donde al menos un
- 10 marcador aviar se selecciona del grupo que consiste en
- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente 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;
- 15 b) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias de acuerdo con (a);
- c) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) o (b).
- En este método, las secuencias se seleccionan preferiblemente del siguiente grupo:
- a) polinucleótidos que tienen una identidad de secuencia de al menos 80%, preferiblemente al menos 85, 90 o 95%, más preferiblemente 100%, a un polinucleótido que comprende al menos 8 o 10, preferiblemente 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,
- 20 b) polinucleótidos (ADNs y ARNs) que son complementarios a las secuencias según (a);
- c) polinucleótidos que comprenden los polinucleótidos de acuerdo con (a) o (b).
- 25 Las aplicaciones de los métodos de acuerdo con la invención son, por ejemplo (i) ayudar en el diagnóstico y/o pronóstico de la enteritis necrótica de las aves, (ii) monitorizar el progreso o reaparición de la enteritis necrótica de las aves, o (iii) ayudar en la evaluación de la eficacia del tratamiento para un sujeto aviar sometido o contemplando tratamiento para enteritis necrótica; en donde se determina la presencia o ausencia de uno o más de los biomarcadores
- 30 mencionados anteriormente en la extracción de ácido nucleico obtenida del método y el uno o más biomarcadores están asociados con el diagnóstico, progreso o recidiva, o la eficacia del tratamiento, respectivamente, de la enteritis necrótica.

Las aplicaciones de la invención particularmente ayudan a evitar la pérdida de rendimiento aviar como el aumento de peso y la conversión alimenticia.

35 Aislamiento de microvesículas

- El aislamiento de microvesículas a partir de una muestra biológica antes de la extracción de ácidos nucleicos es ventajoso, debido a que las microvesículas que contienen ácido nucleico producen rendimientos significativamente más altos de especies de ácidos nucleicos con mayor integridad en comparación con el rendimiento/integridad obtenido extrayendo ácidos
- 40 nucleicos directamente de la muestra de fluido o excremento sin primeras microvesículas de aislamiento. Además, también es posible detectar ácidos nucleicos que se expresan a niveles bajos. El aislamiento de microvesículas también permite la exclusión de proteínas, lípidos,

desechos celulares, células y otros contaminantes potenciales e inhibidores de PCR que se encuentran naturalmente dentro de muestras biológicas.

5 El aislamiento de vesículas de membrana a partir de muestras biológicas y la subsiguiente extracción de los ácidos nucleicos puede realizarse por ejemplo por ultracentrifugación, por ejemplo, hilado a más de 10.000 g durante 1-3 horas, seguido por la eliminación del sobrenadante, el lavado del gránulo, la lisis del gránulo y la purificación de los ácidos nucleicos en una columna. Los métodos alternativos son la ultrafiltración, por ejemplo, utilizando filtros de 100 kD, técnicas de precipitación de polímeros, y/o filtración basada en el tamaño.

10 Otros métodos alternativos 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 permeación de gel como se describe en las Patentes de Estados Unidos N° 6,899,863 y 6,812,023; gradientes de densidad de sacarosa o electroforesis de organelos como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 7,198,923; clasificación de células activadas magnéticas (MACS) según lo descrito por Taylor y Gercel-Taylor (2008); concentración de
15 ultrafiltración de nanomembranas tal como se describe por Cheruvanky et al (2007); gradiente de aislamiento Percoll como se describe por Miranda et al (2010); y, el aislamiento por un dispositivo microfluídico Chen et al (2010).

Aislamiento basado en la superficie de captura de microvesículas según WO 2014/107571

20 En una realización preferida, la fracción de microvesícula está unida a una superficie de captura, particularmente a una membrana, a un filtro o a una perla modificada en superficie como se describe en el documento WO 2014/107571.

La muestra biológica se disuelve preferiblemente en un tampón de carga, que tiene preferiblemente un pH de 4-8, más preferiblemente 5-7. De este modo, la unión a la superficie de captura toma preferiblemente lugar a un pH de 4-8, más preferiblemente de 5-7.
25 Preferiblemente, después de ponerse en contacto la muestra biológica con la superficie de captura, se llevan a cabo una o más etapas de lavado.

Los tampones de carga y de lavado que se pueden emplear de acuerdo con la invención pueden tener una fuerza iónica alta o baja. Por lo tanto, la concentración de sal, por ejemplo, la concentración de NaCl puede ser de 0 a 2,4M. Preferiblemente, los tampones incluyen uno
30 o más de los siguientes componentes: Tris, Bis-Tris, Bis-Tris-Propano, Imidazol, Citrato, Ácido Metil Malónico, Ácido Acético, Etanolamina, Dietanolamina, Trietanolamina (TEA) y Fosfato de Sodio.

El lavado preferiblemente tiene lugar utilizando tampón de lavado que comprende Bis Tris Propano 250 mM y que exhibe un pH de 6,5-7,0.

35 Mediante la adición de detergentes al tampón de lavado se suprime la unión no específica. Los detergentes adecuados para 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, octil glucósido, octil tioglucósido, CHAPS o CHAPSO.

40 Después del lavado de la superficie de captura, el ácido nucleico puede liberarse mediante la lisis de las microvesículas fijas. Para la lisis de las microvesículas fijas se utiliza preferentemente un tampón de lisis basado en fenol, como reactivo de lisis QIAzol® (Qiagen, Alemania). La purificación del ácido nucleico puede hacerse entonces mediante extracción con cloroformo utilizando tubos PLG, seguido de acondicionamiento con etanol. A continuación, el ácido nucleico puede unirse a una columna de sílice antes de lavar y eluir.

- La lisis de microvesículas y la extracción de ácidos nucleicos también puede conseguirse utilizando un kit Qiagen R easy Plus comercialmente disponible, un kit QR de fácil acceso Qiagen disponible comercialmente o usando fenolcloroformo de acuerdo con procedimientos y técnicas convencionales conocidos en la técnica. Tales métodos también pueden utilizar
- 5 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 usando un tampón o solución adecuada para interrumpir la interacción entre los ácidos nucleicos y la columna de unión.
- Los métodos de extracción de ácido nucleico también pueden incluir el uso de otros agentes como un inhibidor de RNasa tal como Superase-In (disponible comercialmente de Ambion Inc.) o RNaseINplus (comercialmente disponible de Promega Corp.); una proteasa (que también puede funcionar como un inhibidor de RNasa); DNasa; un agente reductor; un sustrato de señuelo tal como un ARN sintético y/o ARN portador; un receptor soluble que puede unirse a RNasa; Un pequeño ARN interferente (siRNA); Una molécula de unión a ARN,
- 10 15 tal como un anticuerpo anti-RNA, una proteína básica o una proteína chaperona; una sustancia desnaturizante de RNasa, tal como una solución de alta osmolaridad, un detergente o una combinación de los mismos.
- Los inhibidores de RNasa, así como los agentes adicionales pueden añadirse a la muestra biológica, y/o a la fracción de microvesícula aislada, antes de extraer ácidos nucleicos.
- Estos agentes adicionales pueden ejercer sus funciones de diversas formas, por ejemplo, a través de la inhibición de la actividad de RNasa (por ejemplo, inhibidores de RNasa), a través de una degradación omnipresente de proteínas (por ejemplo, proteasas), oa través de una proteína chaperona (por ejemplo, una proteína de unión al ARN) que se une y protege a los ARN. En todos los casos, tales agentes de mejora de la extracción eliminan o al menos mitigan
- 20 25 algunos o todos los factores adversos en la muestra biológica o asociados con las partículas aisladas que de otro modo impedirían o interferirían con la extracción de alta calidad de ácidos nucleicos de las partículas aisladas.
- La cuantificación de los ARNr 18S y 28S extraídos se puede utilizar para determinar la calidad de la extracción de ácido nucleico.
- La superficie de captura puede ser neutra, cargada negativamente o cargada positivamente. Esto significa que, en principio, se puede utilizar cualquier tipo de superficie de captura. Dependiendo del material de la membrana, los tamaños de poro de la membrana pueden oscilar entre 20 nm y 5 µm.
- En particular, la superficie de captura puede ser una membrana comercialmente disponible como la Membrana de Intercambio de Iones Mustang® de PALL Corporation; Vivapure® Q, Vivapure® Q Maxi H; Sartobind® D, Sartobind®, 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 Thermo Scientific Pierce Strong Cation y Anion Exchange Spin Columns.
- 30 35 40 Cuando se utiliza una membrana para fijar los ácidos nucleicos, entonces la membrana puede estar hecha de una variedad de materiales adecuados, por ejemplo, puede ser una polietersulfona (PES) (por ejemplo, de Millipore o PALL Corp.) o celulosa regenerada (RC) (por ejemplo, de Sartorius o Pierce).
- 45 Cuando se utiliza una membrana cargada negativamente, entonces la superficie de captura es preferiblemente una membrana S, que es una membrana cargada negativamente y es un intercambiador catiónico con grupos ácido sulfónico. Preferiblemente, la membrana S está funcionalizada con ácido sulfónico, R-CH₂-SO₃". Alternativamente, la superficie de captura

cargada negativamente es una membrana D, que es un intercambiador de aniones 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 de aniones básico débil, con dietilaminoetil (DEAE) celulosa.

Cuando se utiliza una superficie de captura neutra, la superficie de captura es preferiblemente un filtro seleccionado del grupo consistente en filtración de jeringa PSN neutra de 20 nm (Tisch y Exomir), filtración de la jeringa de PSN neutral de 30 nm (Sterlitech), filtración de jeringa neutral de 50 nm (Sterlitech), filtración de columna de giro casera neutra de 0,2 μm (Pall), filtración en columna de giro casera de 0.8 μm neutro (Pall) y filtración de jeringa PES de 0.8 μm neutro (Pall). En realizaciones en las que la superficie de captura es neutra, preferiblemente la superficie de captura neutra no está alojada en un filtro de jeringa.

La superficie cargada se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en 0,65 μm cargado positivamente Q PES filtración al vacío, una columna de filtración spin 3-5 μm cargado positivamente, columna de filtración homemade spin Q RC de 0.8 μm cargado positivamente Q PES, jeringa de filtración Q PES 0.8 μm cargado positivamente, columna de filtración homemade spin 0.8 μm cargado negativamente S PES, filtración de la jeringa S PES de carga negativa 0,8 y jeringa de filtración de nylon de carga negativa de 50 nm.

En la realización preferida, cuando la superficie es una membrana cargada positivamente, puede usarse una membrana Q, que es una membrana cargada positivamente y es un intercambiador de aniones con aminos cuaternarios. En una realización preferida, la membrana Q está funcionalizada con amonio cuaternario, $R-CH_2-N^+(CH_3)_3$.

En una realización muy preferida, la membrana cargada positivamente es una membrana de celulosa regenerada, intercambiador aniónico fuerte ("RC/SBAE"), que es un intercambiador de aniones con aminos cuaternarios. 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 preferiblemente de al menos 3 μm .

La superficie de captura, por ejemplo, la membrana, puede alojarse dentro de un dispositivo utilizado para la centrifugación; por ejemplo, columnas giratorias, o para aplicaciones de vacío, por ejemplo, soportes de filtros de vacío, o para filtración con presión, por ejemplo, filtros de jeringa.

En un procedimiento de purificación basado en una columna de espín, preferiblemente se utilizan más de una membrana, preferiblemente de 2 a 5 membranas, en paralelo en un tubo, en donde las membranas son preferiblemente todas 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 preferiblemente adecuada para el hilado, es decir, el tamaño es compatible con las máquinas estándar de centrifuga y microcentrifuga.

En lugar de una membrana también se puede usar un cordón con la misma modificación superficial para capturar el ácido nucleico. Si se utiliza un cordón, puede ser magnético o no magnético.

Si se usa sangre como muestra, la sangre puede por ejemplo ser recogida en tubos de EDTA K2 y mezclada bien con inversiones completas. A continuación, los tubos se centrifugan a 1300xg durante 10 minutos para separar las células sanguíneas y el plasma. A continuación, el plasma se elimina y se filtra a través de un filtro de 0,8 μm para eliminar el residuo celular

y las plaquetas. Todas las muestras de plasma se dividen en alícuotas en crioviales de 1 ml y se almacenan a -80°C hasta su uso.

Antes del aislamiento del ARN, la membrana se acondiciona preferiblemente pasando a través del tampón de equilibrio. La muestra de plasma descongelada se diluye con tampón de carga.

5 La muestra de plasma diluida pasa lentamente a través de la membrana que adsorbe las microvesículas. La membrana se lava entonces con un tampón de lavado para eliminar cualquier componente de plasma ligeramente unido. A continuación, se hace pasar un reactivo de lisis a través de la membrana para lisar las microvesículas. El ARN se aísla utilizando el kit miRNeasy (Qiagen).

10 El ARN se puede evaluar para la calidad y la concentración con el Bioanalyzer 2100 (Agilent) usando un Pico Chip de RNA 6000. La cantidad relativa del ARN extraído se mide mediante RT-qPCR usando ensayos de expresión génica humana seleccionados de Applied Biosystems (Taqman Assay).

15 En realizaciones preferidas, particularmente cuando se usan muestras fecales o cecales solubilizadas, se lleva a cabo una etapa de preprocesamiento antes del aislamiento, purificación o enriquecimiento de las microvesículas para eliminar grandes partículas no deseadas, células y/o restos celulares y otros contaminantes presentes en la muestra biológica. Las etapas de preprocesamiento se pueden lograr a través de 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. Cuando se realizan más de una
20 etapa de pre-procesado de centrifugación, la muestra biológica se puede centrifugar primero a una velocidad más baja ya continuación a una velocidad más alta. Si se desea, pueden llevarse a cabo otras etapas de pre-procesado de centrifugación adecuadas. Alternativamente o además de una o más etapas de pre-procesado de centrifugación, la muestra biológica
25 puede ser filtrada. Por ejemplo, una muestra biológica puede centrifugarse primero a una velocidad baja de aproximadamente 100-500 g, preferiblemente 250-300 g, y después a una velocidad más alta de aproximadamente 2,000 a aproximadamente 200,000 g, preferiblemente a aproximadamente 20,000 g, durante 10 minutos a aproximadamente 1 hora, preferiblemente a una temperatura de 0-10°C, para eliminar partículas grandes no deseadas;
30 La muestra puede entonces ser filtrada, por ejemplo, utilizando un filtro con un tamaño de exclusión de 0.1 a 1.0 µm.

Las microvesículas en el gránulo obtenido por centrifugación a velocidades más altas 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
35 ultrafiltración. De hecho, esta ultrafiltración concentra tanto la muestra biológica como realiza una purificación adicional de la fracción de microvesícula. En otra realización, la filtración es una ultrafiltración, preferiblemente una ultrafiltración tangencial. La ultrafiltración tangencial consiste en concentrar y fraccionar una solución entre dos compartimientos (filtrado y retenido), separados por membranas de determinados umbrales de corte. La separación se
40 lleva a cabo aplicando un flujo en el compartimiento de retenido y una presión transmembrana entre este compartimiento y el compartimiento de filtrado. Se pueden usar diferentes sistemas para realizar la ultrafiltración, tales como membranas espirales (Millipore, Amicon), membranas planas o fibras huecas (Amicon, Millipore, Sartorius, Pall, GF, Sepracor). Dentro del alcance de la invención, es ventajoso el uso de membranas con un umbral de corte por
45 debajo de 1000 kDa, preferiblemente entre 100 kDa y 1000 kDa, o incluso más preferiblemente entre 100 kDa y 600 kDa.

Como pasos de preprocesamiento adicionales o alternativos, se puede llevar a cabo cromatografía de exclusión de tamaño, cromatografía de permeación en gel o cromatografía

de afinidad antes o después de poner en contacto la muestra biológica con la superficie de captura.

5 Para realizar la etapa de cromatografía de permeación en gel, se utiliza preferiblemente un soporte seleccionado entre sílice, acrilamida, agarosa, dextrano, copolímero de etilenglicol-metacrilato o mezclas de los mismos, por ejemplo, mezclas de agarosa-dextrano. Por ejemplo, tales soportes incluyen, pero no se limitan a: SUPERDEX® 200HR (Pharmacia), TSK G6000 (TosoHaas) o SEPHACRYL® S (Pharmacia).

10 La cromatografía de afinidad puede llevarse a cabo, por ejemplo, utilizando diferentes soportes, resinas, perlas, anticuerpos, aptámeros, análogos de aptámeros, polímeros con impresión molecular u otras moléculas conocidas en la técnica que se dirigen específicamente a moléculas de superficie deseadas sobre microvesículas.

15 Opcionalmente, se pueden añadir partículas de control a la muestra antes del aislamiento microvesicular o de la extracción de ácido nucleico para servir como control interno para evaluar la eficacia o calidad de la purificación de microvesículas y/o extracción de ácido nucleico. Estas partículas de control incluyen bacteriófagos Q-beta, partículas virales, o cualquier otra partícula que contiene ácidos nucleicos de control (por ejemplo, al menos un gen diana de control) que puede estar ocurriendo naturalmente o diseñada por técnicas de ADN recombinante. El gen diana de control puede cuantificarse usando análisis de PCR en tiempo real.

20 Preferiblemente, la partícula de control es un bacteriófago Q-beta, denominado en la presente memoria como "partícula Q-beta". La partícula Q-beta puede ser una partícula de virus de origen natural o puede ser un virus recombinante o modificado genéticamente, en el que al menos un componente de la partícula de virus (por ejemplo, una parte del genoma o proteína de recubrimiento) se sintetiza mediante técnicas de ADN recombinante o biología molecular
25 conocidas en la técnica. Q-beta es un miembro de la familia de leviviridae, que se caracteriza por un genoma de ARN de cadena sencilla lineal que consiste en 3 genes que codifican cuatro proteínas virales: una proteína de recubrimiento, una proteína de maduración, una proteína de lisis y una replicasa de ARN. Debido a su tamaño similar a las microvesículas medias, el Q-beta puede purificarse fácilmente a partir de una muestra biológica usando los mismos
30 métodos de purificación usados para aislar microvesículas, como se describe en la presente memoria. Además, la baja complejidad de la estructura de genes de cadena sencilla viral Q-beta es ventajosa para su uso como control en ensayos de ácidos nucleicos basados en amplificación. La partícula Q-beta contiene un gen diana de control o una secuencia diana de control a detectar o medir para la cuantificación de la cantidad de partícula Q-beta en una
35 muestra. Por ejemplo, el gen diana de control es el gen de la proteína de recubrimiento 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 utilizando los métodos de extracción y/o kits descritos en la presente memoria. La detección del gen diana de control de Q-beta puede determinarse por análisis de RT-PCR, por ejemplo, simultáneamente con los biomarcadores de interés (es decir, BRAF). Se puede
40 usar una curva estándar de al menos 2, 3, o 4 concentraciones conocidas en una dilución de 10 veces de un gen diana de control para determinar el número de copias. El número de copias detectado y la cantidad de partícula Q-beta añadida pueden compararse para determinar la calidad del proceso de aislamiento y/o extracción.

45 De este modo, se añaden 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 1.000 o 5.000 copias de partículas Q-beta a una muestra de fluido corporal. En una realización preferida, se añaden 100 copias de partículas Q-beta a una muestra de fluido corporal. El número de copias de las partículas Q-beta se puede calcular basándose en la capacidad del bacteriófago Q-

beta para infectar las células diana. Así, el número de copias de las partículas Q-beta se correlaciona con las unidades formadoras de colonias del bacteriófago Q-beta.

Detección de biomarcadores de ácidos nucleicos

5 Para la detección de ARN, el ARN es preferiblemente transcrito inversamente en ADN complementario (ADNc) antes de una mayor amplificación. Dicha transcripción inversa se puede realizar solo o en combinación con una etapa de amplificación. Un ejemplo de un método que combina etapas de transcripción inversa y amplificación es la reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (RT-PCT), que puede modificarse adicionalmente para que sea cuantitativa, por ejemplo, RT-PCT cuantitativa como se describe en la Patente de Estados Unidos No 5,639,606. Otro ejemplo del método comprende dos etapas separadas: 10 una primera de transcripción inversa para convertir ARN en ADNc y una segunda etapa de cuantificar la cantidad de ADNc usando PCR cuantitativa.

El análisis de RT-PCR determina un valor de Ct (umbral de ciclo) para cada reacción. En RT-PCR, se detecta una reacción positiva por acumulación de una señal de fluorescencia. El valor 15 de Ct se define como el número de ciclos requeridos para que la señal fluorescente cruce el umbral (es decir, excede el nivel de fondo). Los niveles de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico diana, o ácido nucleico de control, en la muestra (es decir, cuanto menor 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 puede medirse 20 usando otras técnicas reconocidas en la técnica.

El análisis de los ácidos nucleicos presentes en las partículas aisladas es cuantitativo y/o cualitativo. Para el análisis cuantitativo, las cantidades (niveles de expresión), ya sean relativos o absolutos, de ácidos nucleicos específicos de interés dentro de las partículas aisladas se miden con métodos conocidos en la técnica. Para el análisis cualitativo, las 25 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

30 *Clostridium perfringens* aislante positivo para netB y tpeL se retiró de -80°C de almacenamiento y asépticamente rayado en tripticasa agar de soja placas que contienen 5% de sangre de oveja (TSA II). Las placas se incubaron a 37°C durante la noche en condiciones anaeróbicas. Quince horas antes del comienzo del cultivo de inóculo, se inoculó una colonia aislada de la placa durante la noche en 50 ml de caldo BHI pre-reducido y se incubó a 37°C 35 en condiciones anaeróbicas durante aproximadamente 15 horas. A continuación, se añadieron 50 µl del cultivo a 2 x 100 ml de caldo BHI pre-reducido. Los cultivos de caldo resultantes se escalonaron de modo que la dosis alta y la dosis baja alcanzaron sus concentraciones finales al mismo tiempo (10⁹ cfu/ml y 10⁶ cfu/ml, respectivamente). Se tomaron alícuotas de cada cultivo al final del período de crecimiento y se sembraron en serie sobre agar TSA II + 5% de sangre de oveja para verificar la concentración bacteriana.

40 Experimento con animales

Sietecientos veinte (720) pollos machos criados en 36 corrales de batería durante 30 días. Las aves fueron asignados de forma igualitaria y aleatoria (9 corrales cada uno) en uno de los cuatro grupos de tratamiento (control negativo, farsa, gavaje de dosis baja y dosis alta de sonda). Las aves fueron alimentadas con maíz estándar/alimentación de soja sin antimicrobianos. En el 13° día de cría, se retiraron de todos los corrales las aves de más o 45 menos peso y se excluyeron del experimento. El pájaro con rango de peso normal fue

desafiado oralmente con 1 ml de cepa de *C. perfringens* que albergaba el plásmido netB y que era positivo para el gen TpeL sucesivamente a los días 14, 15 y 16. El grupo de simulación se desafió con 1 ml de PBS, mientras que el grupo de control negativo no se sometió a ningún estrés o desafío de patógenos. Antes de la primera inoculación (día 14), se seleccionaron al azar 3 aves de cada corral, se sacrificaron para la recogida de muestras de sangre y digesta. Doce horas después del segundo desafío, al día 15, se sacrificaron de nuevo tres aves de cada corral para la muestra de sangre y digesta. Los contenidos de tripa de todas las aves sacrificadas se cultivaron durante la noche para determinar la proporción de *C. perfringens* esporulada a las células vegetativas como se describió previamente (Heikinheimo et al., 2004). Para evaluar si el desafío fue exitoso, se realizó la PCR de los genes NetB y TpeL del contenido intestinal. Al menos 10 aves fueron dejadas en cada una de los corrales hasta el final del ensayo. Se recogieron muestras de excretas a intervalos hasta que el estudio terminó el día 20 cuando se sacrificaron todas las aves y se obtuvieron tres muestras de sangre agrupadas de cada grupo. GIT de las aves se examinaron para NE signos/lesiones típicos y necropsias del tracto gastrointestinal se tomaron de duodeno y yeyuno para el análisis histopatológico. Se determinaron los indicadores de rendimiento de los broilers como la tasa de mortalidad, el consumo de alimento y la patología de grupo (tabla 3).

Colección de muestra

1. Colecciones de muestras de excreta fecal y cecal

Se colocaron hojas de papel en los corrales para recolectar muestras fecales y agrupadas de cecales cada 2 horas después del primer desafío hasta 12 horas después de la segunda inoculación (día 15). Posteriormente, se recogieron muestras cada 4 horas hasta el día 17. Al final del ensayo el día 20, se recogieron también muestras fecales y cecales. Durante cualquiera de los eventos de recolección se obtuvieron al menos 1 gramo de fecal y cecal por corral, y las muestras se almacenaron a -80°C.

2. Colección 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 corral y se transfirieron a tubos de recogida que contenían EDTA. Las células se retiran del plasma por centrifugación durante 10 minutos a 1,000-2,000 x g usando una centrífuga refrigerada. Después de la centrifugación, el componente líquido (plasma) se transfirió inmediatamente a un tubo de polipropileno limpio y se almacenó a -20°C.

3. Recolección de contenidos intestinales

El contenido de intestino se recogió de un intestino de aproximadamente 20 cm de longitud. El contenido de intestino se expulsó y se escindió en PBS + 20% de glicerol y se congeló inmediatamente a -20°C. Se han utilizado entonces muestras para la cuantificación de *C. perfringens* vegetativo versus esporulado y detección por PCR de netB y tpeL.

Histología del intestino del pollo

1. Recolección y procesamiento de tejidos

Se retiró una sección de 5 cm después del bucle duodenal de cada ave y se colocó en formalina al 10%, y el recipiente se agitó suavemente para desalojar el alimento para permitir que la formalina penetrara 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 almacenamiento. Para el procesamiento de tejidos y la infiltración de tejidos con parafina antes de hacer una sección de 5 µM, los tejidos se deshidrataron lavando 1x durante

2 min en disoluciones de etanol al 70% y 95% sucesivamente y luego 2x durante 2 min en solución 100% de etanol. Finalmente, los tejidos se enjuagaron 2 veces durante 1 minuto en xileno antes de ser embebidos en parafina. El tejido procesado se orientó entonces en un molde, embebido en un bloque de parafina y cortado en un microtome para generar secciones de 5 µM. Las láminas de tejido se hacen flotar sobre portaobjetos modificados con poli-L-lisina (PLL). Los portaobjetos se secan y se colocan en un horno para "hornear" la parafina.

2. Tinción de secciones de tejido con Harris Hematoxilina y Eosina.

En resumen, las secciones se rehidrataron mediante concentración sucesiva de etanol: 2x durante 3 min cada una en etanol al 100%, 2x durante 3 minutos cada uno en etanol al 95% y 1x durante 3 minutos en etanol al 70%. A continuación, las placas se lavaron durante 5 minutos en agua destilada y después se tiñeron durante 6 minutos con solución de Hematoxilina (Harris Hematoxylin, Sigma, HHS-32). Las láminas se aclararon en agua corriente durante aproximadamente 20 minutos y se decoloraron en alcohol ácido (95% de etanol, 2578 ml de dH₂O, 950 ml de HCL, 9 ml) durante 1-3 segundos. Las láminas se enjuagaron de nuevo con agua del grifo corriente durante 5 minutos, luego se sumergieron en carbonato de litio durante 3 segundos y después se aclararon con agua del grifo durante 5 minutos. Los tejidos se contrastaron con solución de trabajo de eosina (100 ml de stock de eosina (1% de Eosina-Y acuosa y 1% de Phloxin B), 10 ml de stock de Phloxin B, 780 ml de etanol al 95%, 4 ml de ácido acético glacial) durante 15 segundos y se rehidrataron mediante incubación sucesiva en soluciones etanólicas (2 durante 3 minutos cada una en solución etanol al 95% y 2x durante 3 minutos cada una en solución 100%). Finalmente, los tejidos se incubaron en solución de xileno durante 5 minutos y luego se montaron con citosa para su análisis.

Detección de Clostridium perfringens netB y genes tpeL por PCR

Tabla 1. pares de cebadores utilizados para la detección de los genes netB y tpeL en aislados de Clostridium perfringens del intestino del pollo

Cebador ID	Secuencia	Gene Objetivo	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

El ADN extraído de cepas de *C. perfringens* aisladas de contenido intestinal se realizó con kits comerciales de extracción de ADN de Qiagen, Hilden, Alemania, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

2. Amplificación del ADN

La amplificación por PCR se realizó en un volumen final de 25 µl que contenía 1 ng de plantilla de ADN, 0,2 µM de cada uno de los cebadores para que el gen sea amplificado o detectado y 12 µ de mezcla madre PCR 1x que consta de 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 (Master cycler eppendorf, Alemania). La desnaturalización inicial fue de 95°C durante 5 minutos, seguido de 40 ciclos durante 95°C durante 30 segundos, recocido a 55°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 30 segundos, con una extensión final a 72°C durante 7 minutos y mantener durante 40°C.

Procesamiento de muestras

Se procesaron un total de 36 muestras de plasma, 96 muestras fecales y 87 muestras cecales para aislamiento y extracción de ARN total de microvesícula. Los volúmenes de plasma variaron entre 0.5 ml a 3 ml de los diferentes animales.

Preparación de plasma

Brevemente, se recogió sangre en tubos de EDTA K2 y se mezcló bien con inversiones completas. A continuación, los tubos se centrifugaron a 1300 x g durante 10 minutos para separar las células sanguíneas y el plasma. A continuación, se eliminó el plasma y se filtró a través de un filtro de 0.8µm para eliminar el residuo celular y las plaquetas. Todas las muestras de plasma se dividieron en partes alícuotas en crioviales de 1 ml y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Aislamiento de microvesículas y extracción de ARN

Los métodos de extracción de microvesículas y la posterior purificación de los contenidos de microvesículas (MV) a partir de biomateriales tales como sangre, csf, tejidos y cultivos celulares se han descrito anteriormente en US 6899863B1 (Dhelli et al., 2005), EP 2 495 025 A1, WO 2014/107571 A y 20140178885A1. Los métodos incluyen el uso de ultracentrifugación de alta velocidad, o el uso de centrifugación a baja velocidad para separar los restos celulares seguido por exclusión de tamaño o afinidad de unión a membranas específicas o filtración (ver revisión por Witwer & Colegas, 2013). Varios métodos inmunológicos de purificación de microvesículas han sido también descritos (Thery, et al., 2016, Clayton et al., 2001, Wubbolts et al., 2003). Las microvesículas se pueden purificar mediante el uso de matrices, perlas o partículas magnéticas funcionalizadas con anticuerpos que se unen a proteínas de superficie de microvesículas para seleccionar positivamente una población deseada o con anticuerpos que se unen a proteínas de superficie de otros componentes celulares para su agotamiento (Kim et al., 2012 y Mathivanan et al., 2010). Los métodos rápidos de aislamiento de microvisicles disponibles para investigación incluyen el uso de dispositivos microfluídicos (2010, Chen, et al., 2010; EP 2740536 A2) y equipos comerciales (por ejemplo, SeraMir™ (Sistema Biosciencias), ExoSpin™ (Cell Guidance), ExoMir™ (Bioo Scientifics), miRCURY™ (Exiqon), que requieren poco o ningún equipo de laboratorio especializado.

En este caso, la extracción de microvesículas de plasma, muestras fecales y cecales se realizó por los métodos descritos en WO2014/107571A1 (Enderle, et al., 2014). El método implicó el aislamiento de microvesículas de un fluido biológico capturándolas en la superficie

de un filtro de membrana funcionalizado Q (Exo50, Exosome Diagnostics). El contenido de ARN de las microvesículas capturadas se liberó por lisis con Qiazol y, a continuación, se purificó el ARN mediante extracción con cloroformo o con un kit comercial RNAeasy de Qiagen. En resumen, la muestra de plasma se dejó descongelar lentamente sobre hielo y se diluyó 1:1 con PBS o NaOH al 0,9%; La solución de plasma se centrifugó a 300 g durante 10 minutos para eliminar las células y los desechos. El sobrenadante se hizo pasar a través de un filtro de 0,8 µm y luego se centrifugó el flujo a 20,000 g a 4°C durante 30 minutos para eliminar cualquier residuo celular restante. La columna Exo50 con membrana de afinidad que se une a microvesículas se preconditionó permitiendo que pasaran a través de ella 5 ml de tampón de carga (2X) tampón de fosfato 100 mM, NaCl 370 mM). A continuación, el sobrenadante que contenía las microvesículas obtenidas a partir de la segunda etapa de centrifugación se puntó 1000 copias de partícula Qbeta para examinar la extracción y la eficiencia de recuperación tras la carga sobre la columna de centrifugación preacondicionada. La columna se giró brevemente y se descartó el flujo. La columna se lavó dos veces con 2 ml de tampón de lavado (Bis Tris Propano 250 mM, pH 6,5-7 y tampón de fosfato (IX) 50 mM, NaCl 185 mM) y después del segundo lavado, se giró brevemente la columna y se descartó el flujo. Las microvesículas unidas a la membrana se lisaron 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. El ARN se extrajo del lisado con el kit RNeasy, Qiagen, siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN eluido con agua libre de ARNasa se reunió para muestras duplicadas para obtener un volumen total de 46 µL por muestra. 1 µL de ARN se aplicó en Agilent RNA 6000 Nano Kit para evaluar la calidad y la concentración del ARN, mientras que el resto de ARN se almacenó a -80°C para más abajo el uso (QPCR o secuenciación). La eficacia de extracción y la cantidad de extracción de ARN se evaluó comparando la expresión del gen diana de control Q-beta (gen de la proteína de recubrimiento Q-beta) en el ARN extraído por análisis de RT-PCR con los de los genes diana de interés. Se usó una curva estándar de al menos 2, 3, o 4 concentraciones conocidas en una dilución de 10 veces de un gen diana de control para determinar el número de copias. El número de copias detectado y la cantidad de partícula Q-beta añadida se compararon para determinar la calidad del proceso de aislamiento y/o extracción.

Muestras fecales y cecales

- Dado que las muestras de plasma y cecal contienen grandes materiales gruesos, se aplican etapas de preprocesamiento adicionales antes de realizar el aislamiento de microvesículas y la extracción de ARN utilizando el kit Exo50 y los métodos asociados como se describió anteriormente para muestras de plasma. Por ejemplo, se dejó descongelar lentamente 200 mg de muestra fecal; luego se añadió 1 ml de PBS frío o NaOH estéril al 0,9% para homogeneizar la muestra fecal/cecal seguido de agitación 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 minutos a 4°C para eliminar partículas grandes no deseadas. El sobrenadante se filtró a través de un filtro de éster de celulosa mezclado de 0,8 µm (por ejemplo, un filtro Millipore) y el filtrado se almacenó a 4°C hasta su uso posterior o se procesó como se ha descrito para la muestra de plasma anterior.

- Tabla 2. Lista de los cebadores y la sonda utilizada para qPCR para cuantificar los niveles de expresión de los objetivos. Los miRNA se adquirieron de Life Technologies y los cebadores y sondas diseñados en casa fueron sintetizados por IDT (Integrated DNA Technologies, USA)

Objetivo	Ensayo ID / Cebadores y sondas (donde corresponda)
miR-155	TM:000479 (Life Technologies #4427975)
miR-16	TM:000391 (Life Technologies #4427975)
miR-24	TM:000402 (Life Technologies #4427975)
miR-206	TM:000510 (Life Technologies #4427975)
virX (IDT)	Adelante: 5'- TCGTATTCACTGTAGGAGAACAAG -3' Inversa: 5'- TGAGCTTTTCTTGCTTTTCTGC -3' Sonda: 5'- /56-FAM/ ACGATCCAG /ZEN/ TTAGATGCCAGCTTG/3IABkFQ/ -3'
NetB (IDT)	Adelante: 5'- TGGTGCTGGAATAAATGCTTCA -3' Inversa: 5'- ACCGTCCTTAGTCTCAACAA -3' Sonda: 5'- /56-FAM/ TGATGCAAA /ZEN/ TTTAGCATCATGGGA/3IABkFQ/ -3'
SAM (IDT) SybrGreen assay	Adelante: 5'- AAATAAGGAGTTGATAAACATGAAA -3' Inversa: 5'- TGTTACTGGTGAACAACAAAAAT -3'
colA (IDT)	Adelante: 5'- TGAAAGAACACCAGAGGAAAGT -3' Inversa: 5'- CCTGCAAAGAACTCTGCTGT -3' Sonda: 5'- /56-FAM/ TGATGCAAA /ZEN/ GTGGGGGCAAGGA /3IABkFQ/ -3'

CPE0956 (IDT) SybrGreen assay	Adelante: 5'- AATAGGATTTATAGCTGGAT -3' Inversa: 5'- AGTTAGTTTTCCAAGGATAG -3'
scRNA (IDT) SybrGreen assay	Adelante: 5'- TATGTAAGTGGTGTGAGAG -3' Inversa: 5'- ATGAAAATGACTGCTTATC -3'

QRT-PCR de RNA derivado fecal / cecal

La transcripción inversa del ARN fecal y cecal se realizó con el Kit de Síntesis de cDNA SuperScript VILO siguiendo las instrucciones del fabricante y las siguientes modificaciones:

5 La reacción de RT consistió en 11µl (Mezcla de Reacción VILO 5x), 5.5µl (Mezcla de Enzimas SS 10x), 5.5µl (H2O libre de nucleasa) y 33µl (ARN). Mientras que el perfil de ciclo de RT consistía en 4 ciclos de incubación secuenciales/mantenimiento a 25° durante 10 min, 42° durante 60 minutos, 85° durante 5 minutos y una etapa de retención final a 4°C.

Q RT-PCR para plasma y miARN derivado fecal/cecal:

- 10 La transcripción inversa del miARN se realizó por triplicado para cada muestra usando transcripción inversa de ARN usando TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit con la siguiente receta de mezcla maestra de RT y el perfil de ciclismo: la reacción de RT consistía en 6 µl (pool de cebadores RT), 0.3 µl (dNTPs de 100 mM), 1.5 µl (10x tampón RT), 0.2 µl de inhibidor de RNasa, 3,0 µl de MultiScribe RT y 4 µl (4 µl de ARN para muestras fecales y
- 15 cecales, y 2 µl de ARN + 2 µl de tampón TE para muestras de plasma). Mientras que el perfil de ciclo de RT consistía en 4 ciclos de incubación secuenciales/explotaciones a 16° durante 30 minutos, 42° durante 30 minutos, 85° durante 5 minutos y una etapa de retención final a 4°. El pool de cebadores de RT se obtuvo mediante 10 microlitros de cada cebador de RT y se diluyó a 1 ml con tampón TE, haciendo la concentración final de cada cebador de RT 0,05X.
- 20 Se añadieron cinco veces (5 x) 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

- QPCR se realizó para la prueba de los ensayos basados en genes de ARN utilizando Qiagen Rotor -Gene Q, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La temperatura de recocido de
- 25 los ensayos virX, colA y netB fue de 57°C, mientras que la temperatura de recocido para el análisis del ARNr 16s de Clostridium perfringens fue 60°C. Las reacciones de mezcla maestra para los ensayos consistieron en 5.5µl (agua libre de nucleasa), 10 µl (TaqMan Fast Universal PCR Master Mix sin AmpErase UNG), 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-glicosilasa) y 2 µl de
- 30 ADNc. Para la amplificación de 16s ARN, 1 µl de cada uno de adelante y de atrás se utilizó.

- Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit se realizó para ARN poco codificante VR-ARN, e45nt y scRNA. Las reacciones de mezcla maestra para los ensayos consistieron en 5.75µl (agua libre de nucleasa), 10 µl de Rotor Gene SYBR 2x Master Mix), 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-glicosilasa) y 2 µl de cDNA. La amplificación se realizó con la siguiente condición: Primera
- 35 etapa de mantenimiento a 50° C durante 2 min, seguida por otra retención a 95°C durante 10 y luego 40 ciclos consistentes en 95°C durante 2 segundos, 60° durante 15 s 72°C durante 20 s.

Análisis estadístico

Todos los cálculos estadísticos se realizaron utilizando el software estadístico R. Como resultado de la estequiometría del ensayo y la eficiencia general de los protocolos analíticos, se imputó la sustitución de los valores faltantes (sin señal) antes de la normalización con 40, que es el valor CT más alto posible en un qPCR con 40 ciclos de amplificación. Se calcularon las estadísticas moderadas para la comparación de pares de los grupos de tratamiento con la función lmFit en el paquete limma (limma: modelos lineales para datos de microarrays, Smyth GK In: Bioinformática y Soluciones de Biología Computacional utilizando R y Bioconductor, Springer, Nueva York, páginas 397-420, paquete R, versión 2.16.5) y los valores de p resultantes se ajustaron de acuerdo con el método de Benjamini y Hochberg, (1995) para obtener los valores q (tasa de descubrimiento falso)

Análisis multivariante (ANOVA)

La dependencia entre el tiempo, el tratamiento y el tipo de muestra se examinó cualitativamente. Una evaluación cuantitativa formal de las asociaciones posibles se realizó mediante ANOVA bidireccional y pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis. Ambos métodos se han aplicado independientemente a miARN y ARN bacteriano datos. El ANOVA de dos vías se utilizó para probar dos efectos principales y una interacción. El primer efecto principal fue el tiempo tras el tratamiento (en horas), el segundo efecto principal fue el tipo de tratamiento (control, farsa, dosis alta, dosis baja). La prueba de Kruskal-Wallis se aplicó por separado a tiempo y tratamiento, para probar una asociación de estos factores con la expresión génica. No se evaluó la interacción multi-variable mediante este método. Se analizaron tres tipos de muestras (cecales, excretas y plasma) para 4 miRNAs (miR-16, miR-24, miR-155 y miR-206) y un total de 216 datos duplicados. También se analizaron seis blancos bacterianos en dos tipos de muestra (cecal y excreta) y un total de 108 datos duplicados. Los medios de los datos duplicados (valor medio de Ct de cada muestra) se utilizaron para análisis estadísticos adicionales. El análisis se realizó tanto en datos brutos como en datos normalizados. El MiR-191 se usó como normalizador para el análisis de microARN, mientras que los valores de Ct del ARNr 16S de *C. perfringens* se usaron como normalizadores para las bacterianas dianas. El modelo lineal anova (Anova (lm (expresión ~ tiempo + tratamiento + tiempo * tratamiento)) generó valores de p para tres factores (efecto-tiempo, efecto-tratamiento, interacción) para los datos normalizados y crudos, mientras que los valores de 2 p (efecto de tiempo y efecto de tratamiento) se generaron a partir de los análisis con la prueba de Kruskal-Wallis para los datos normalizados y en bruto.

Resultados:

Tabla 3. Número de aves muertas por grupo después del desafío de *C. perfringens*. Un pájaro estaba muerto en cada uno de los grupos: grupo de gavaje de dosis baja, grupo de simulación y grupo de control negativo. 4 aves estaban muertas en el grupo de aves desafiadas con altas dosis de *Clostridium perfringens*.

Grupo	Tamaño inicial del grupo	Pajaros sacrificados por días de sangrado 14 y 15	Aves perdidas tras la inoculación de <i>C. perfringens</i>	AFCR* – Después del desafío	Porcentaje con patología macroscópica típica	No hay señales de pérdida de rendimiento y enfermedad
Alta dosis de alimentación forzada	180	54	4	1.60	50.70	49.30%

Baja dosis de alimentación forzada	180	54	1	1.60	42.12	57.88%
Falso	180	54	1	1.57	6.06 ^b	93.94%
Control negativo	180	54	1	1.56	3.13	96.87%
Valor de p			0.200	0.746	<0.001	

* AFCR (relación de conversión de pienso ajustada) determinada como la cantidad de alimento consumido dividido por el peso corporal de las aves, corregido para mortalidades y aves eliminadas debido al desvío de peso del peso de las aves antes del desafío

- 5 Tabla 4: Marcadores con presencia significativamente mayor en vesículas de membrana de excrementos cecales

Marcador	Raw FDR	Norm FDR
Región Sam	1,21E-09	9,24E-02
Región Swim de dedo de Cinc	9,52E-09	9,78E-02
scRNA	3,21E-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
VR.RNA	2,89E-03	3,21E-05
colA	6,11E-03	3,73E-04

Tabla 5: Marcadores con presencia significativamente mayor en vesículas de membrana de excrementos fecales

Marcador	Raw FDR	Norm FDR
Región Sam	2,63E-11	8,18E-03
scRNA	8,94E-05	8,64E-04
netB	2,45E-04	2,75E-03
virX	3,24E-03	9,78E-02
colA	5,01E-03	8,68E-04

Región Swim de dedo de Cinc	5,81E-02	2,26E-03
VR.RNA	1,36E-01	1,03E-04

Tabla 6: Marcadores con presencia significativamente mayor en vesículas de membrana de muestras de sangre

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

5 Lista de referencias

1. Thery C, Amigorena S, Raposo G, Clayton A (2006). Aislamiento y caracterización de exosomas de sobrenadantes de cultivos celulares y fluidos biológicos. Curr Protoc Cell Biol., Capítulo 3: Unidad 3.22.
2. Clayton A, Tribunal J, Navabi H, Adams M, MD Mason, Hobot JA, et al. (2001). Análisis de exosomas derivados de células que presentan antígenos, basados en el aislamiento inmuno-magnético y la citometría de flujo. J Immunol. Métodos. 2001; 247: 163 - 74.
3. Wubbolts R, Leckie RS, Veenhuizen PT, Schwarzmann G, Mobius W, Hoernschemeyer J, et al. (2003). Análisis proteómicos y bioquímicos de los exosomas derivados de células B humanas. Posibles implicaciones para su función y formación de cuerpos multivesiculares. J Biol Chem., 278: 10963 - 72.
4. Kim G, Yoo CE, Kim M, Kang HJ, Park D, Lee M, y col., (2012) Noble superficie polimérica conjugada con restos zwitteriónicos y anticuerpos para el aislamiento de exosomas de suero humano. Bioconjug. Chem., 23: 2114 - 20.
5. Mathivanan S, Lim JW, Tauro BJ, Ji H, Moritz RL, Simpson RJ (2010). El análisis proteómico de los exosomas purificados por inmunoafinidad A33 liberados de la línea de células tumorales del colon humano LIM1215 revela una firma de proteína específica de tejido. Mol. Celda. Proteomics, 9: 197-208.
6. Modelos lineales de Smyth G.K (2004) para datos de microarrays In: Bioinformatics and Computational Biology Solutions usando R y Bioconductor, Springer, New York, pp 397-420
7. Hochberg y Roy (1995) Control de la tasa de falsos descubrimientos: un enfoque práctico y poderoso para múltiples pruebas. Diario del Royal Statistical Soc. Ser B (Methodological), 57: 289 - 300
8. Heikinheimo, A, y Lindström, M, y Korkeala, H. (2004) Enumeración y Aislamiento de cpe-Positive Clostridium perfringens esporas de heces. Journal of Clinical Microbiology, 42, 9: 3992 - 3997

9. Dinh, H., et al., Modulación de microRNAs en dos líneas de pollo genéticamente dispares mostrando diferentes susceptibilidades a la enfermedad de enteritis necrótica. Veterinario. Immunol. Immunopathol. (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2014.02.003>
- 5 10. Aade, U.P., y Wankhede, H.J, y Kaldete, K.D (2012). Cambios en los parámetros hematológicos en Gallus gallus domesticus infectados con parásito cestode. International Multidisciplinary Research Journal, 2 (4): 13-15
11. Chuku LC et al. (2012) Una comparación de los índices hematológicos y bioquímicos de aves de corral y gallinas rojas (gallus gallus domesticus), Discovery Nature, 2012, 1 (1), 15-18,
- 10 12. Wang et al. (2012) Análisis integrado de la expresión de microARN y transcriptoma de mRNA en pulmones de pollos de engorda infectados con el virus de la influenza aviar BMC Genomics 2012, 13: 278
13. Jiang et al. (2014) Las vesículas de membrana de Clostridium perfringens tipo A inducen inmunidad inducida y adaptativa. Revista Internacional de Microbiología Médica 304 (2014)
- 15 431-443
14. Obana, et al. (2013) Requisito Estructural en Clostridium perfringens Colagenasa mRNA 5'Leader Sequence para inducción traslacional a través de ARN-mRNA pequeño par de bases Journal of Bacteriology, Volumen 195 Número 12 p. 2937-2946
15. Ohtani et al. (2002). Identificación de un nuevo locus que regula la expresión de genes de la toxina en Clostridium perfringens FEMS Microbiology Letters, 209: 113-118
- 20 16. Nakamura et al. (1995) El pequeño ARN citoplásmico (scRNA) gen de Clostridium perfringens puede reemplazar el gen para el scRNA de Bacillus subtilis tanto en crecimiento como en esporulación Microbiology (1995), 141: 2965-2975
17. KEYBURN et al. (2010) Asociación entre enteritis necrótica aviar y cepas de Clostridium perfringens que expresan toxina NetB Vet. Res. 41:21
- 25 18. Shojadoost et al. (2012). La inducción experimental exitosa de enteritis necrótica en pollos por Clostridium perfringens: una revisión crítica Veterinary Research, 43:74
19. Koga et al. (2011) El exosoma puede prevenir la RNasa de degradar el microRNA en las heces. J Gastrointest Oncol 2011; 2: 215 - 222.
- 30 20. Saleem, Gulbeena (2013) Identificación de marcadores bioquímicos para la enteritis necrótica subclínica en pollos de engorde (En enteritis necrótica, inducción de enfermedad, factores predisponentes y nuevos marcadores bioquímicos en pollos de engorde), capítulo 8, tesis doctoral, Universidad de Glasgow, REINO UNIDO.
21. Garcia et al. (2009). Infección experimental de capas comerciales utilizando una cepa de Salmonella enterica serovar Gallinarum: Concentraciones de proteínas de leucograma y suero de fase aguda. Revista Brasileira de Ciencia Avícola 11, 263-270.
- 35 22. Piercy (1979). Respuestas de fase aguda a la salmonelosis experimental en becerros y colibacilosis en pollos: hierro sérico y caeruloplasmina. Journal of Comparative Pathology 89, 309 - 319.
- 40 23. Witwer et al. (2013) Estandarización de la recolección de muestras, aislamiento y métodos de análisis en la investigación de vesículas extracelulares Journal of Extracellular Vesicles, 2: 20360

24. Nilsson, et al. (2009) Exosomas de orina derivados del cáncer de próstata: un nuevo enfoque para los biomarcadores para el cáncer de próstata. Br J Cancer, 100: 1603 - 7.
25. Li et al. (2009) Claudina que contiene exosomas en la circulación periférica de las mujeres con cáncer de ovario. BMC Cancer, 9: 244.
- 5 26. Shao et al. (2012) La tipificación de proteínas de las microvesículas circulantes permite la monitorización en tiempo real de la terapia con glioblastoma. Nat Med., 18: 1835 - 40.
27. Taylor y Gercel-Taylor Taylor (2008) Las firmas de microRNA de exosomas derivados de tumores como biomarcadores diagnósticos de cáncer de ovario Gynecologic Oncology, 110: 13-21
- 10 28. Cheruvanky et al. (2007) Aislamiento rápido de biomarcadores exosomales urinarios utilizando un concentrador de ultrafiltración nanomembrana. Am J Physiol Renal Physiol., 292: F1657 - 61.
29. Miranda et al (2010) Los ácidos nucleicos dentro de los exosomas/microvesículas urinarias son biomarcadores potenciales para la enfermedad renal. Kidney Int., 78: 191 - 9.
- 15 30. Chen et al. (2010) Aislamiento microfluídico y análisis de transcriptoma de microvesículas séricas. Lab Chip., 10: 505 - 11.
31. Skog et al. (2008). Las microvesículas de glioblastoma transportan ARN y proteínas que promueven el crecimiento tumoral y proporcionan biomarcadores de diagnóstico. Nat Cell Biol., 10: 1470 - 6.
- 20 32. Moore et al. (2008). Clostridium toxin netB (WO 2008/148166)
33. Dhellin et al. (2005). 1. Procedimiento para preparar vesículas de membrana (US6.899.863B1)
34. Lamparski et al. (2004) Método de producción de vesículas de membrana (US6.812.023B1)
- 25 35. Abrignani et al. (2007) Método para la preparación de ARN de VHC purificado mediante separación de exosomas (documento US 7.198.923 B1)
36. Giorgio (2012) Filtro para la eliminación de micro-vesículas de fluidos biológicos, métodos y dispositivos utilizando dicho filtro (EP 2495025 A1)
37. Enderle et al (2014) métodos para aislar microvesículas (documento WO2014 / 107571)
- 30 38. Kyung-Hee et al. (2014) Composición y kit para diagnosticar cáncer de mama incluyendo polinucleótido dentro de la vesícula, y método para diagnosticar cáncer de mama usando el mismo (US 20140178885A1)
39. Min Soak y Jong-Myeon (2014) Aparato microfluídico y método para enriquecer el material objetivo en una muestra biológica utilizando el mismo (EP2740536 A2)

35