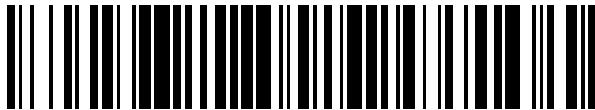


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 387 243**

(21) Número de solicitud: 201031774

(51) Int. Cl.:

C07K 14/155 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
A61K 39/12 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

(12)

PATENTE DE INVENCIÓN

B1

(22) Fecha de presentación:
30.11.2010

(43) Fecha de publicación de la solicitud:
18.09.2012

Fecha de la concesión:
19.07.2013

(45) Fecha de publicación de la concesión:
31.07.2013

(73) Titular/es:

**UNIVERSIDAD PUBLICA DE NAVARRA (50.0%)
CAMPUS ARROSADIS S/N OTRI EDIF. SARIO
31006 PAMPLONA (Navarra) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (50.0%)**

(72) Inventor/es:

**RAMÍREZ ÁLVAREZ, Hugo;
DE ANDRÉS, Ximena;
REINA ARIAS, Ramsés;
DE ANDRÉS CARA, Damián y
AMORENA ZABALZA, Beatriz**

(74) Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

(54) Título: **PÉPTIDOS PARA DETECTAR ESTIRPES DE LENTIVIRUS**

(57) Resumen:

Péptidos para detectar estirpes de lentivirus. La presente invención describe una serie de péptidos que se corresponden con sitios antigenicos nuevos, de estirpes Españolas de virus del grupo LVPR (género Lentivirus), en concreto estirpes de las regiones geográficas de Castilla-León, Aragón y Navarra de los tipos filogenéticos B (frecuentemente implicados en la enfermedad artrítica), A (comúnmente responsables de las formas pulmonar o nerviosa). Estos péptidos son útiles para el diagnóstico de la infección por LVPR, por tanto la presente invención describe también nuevos métodos de diagnóstico in Vitro de la infección por LVPR y kits o dispositivos de ensayo para su ejecución.

ES 2 387 243 B1

DESCRIPCIÓN**PÉPTIDOS PARA DETECTAR ESTIRPES DE LENTIVIRUS****Campo de la técnica**

La presente invención se encuadra dentro de las 5 herramientas biotecnológicas y métodos para ayuda al diagnóstico de enfermedades veterinarias de etiología infecciosa. Más específicamente, la presente invención aporta una nueva herramienta biotecnológica para la ayuda al diagnóstico de infecciones por estirpes españolas de 10 campo de los lentivirus del ganado ovino y caprino (LVPR). Por lo tanto, la presente invención se encuadra también entre aquellas herramientas biotecnológicas que proporcionan métodos de control de las estirpes más peligrosas y patógenas de LVPR que aparecen en determinadas 15 áreas geográficas.

Estado de la técnica

Los lentivirus de pequeños rumiantes (LVPR), que incluyen el virus (VMV) y el de la artritis encefalitis 20 caprina (VAEC), son un grupo de virus muy heterogéneo desde un punto de vista genético y antigénico que afectan al ganado ovino y caprino (pequeños rumiantes) causando una infección multisistémica, caracterizada por la presencia de inflamación e infiltración linfocitaria, generalmente en 25 mama, pulmones, articulaciones y encéfalo (Reina et al., 2009a). La transmisión natural ocurre de madres a hijos por vía lactogénica o entre animales adultos por medio de secreciones o aerosoles (Blacklaws et al., 2004). Además se ha descrito transmisión de ovejas a cabras y viceversa, 30 especialmente en rebaños mixtos (Gjerset et al., 2007; Grego et al., 2007; Pisoni et al., 2005; Shah et al., 2004). Actualmente los LVPR se clasifican según estudios

filogenéticos en 5 genotipos (A-E). El genotipo A engloba las estirpes pertenecientes al VMV clásico causantes generalmente de neumonía intersticial y encefalitis, el genotipo B las pertenecientes al clásico VAEC 5 frecuentemente causantes de artritis y encefalitis en cabritos (Shah et al., 2004), el genotipo C al que pertenecen aislados de caprinos y ovinos de Noruega (Gjerset et al., 2009), el genotipo D tan solo presente en Suiza y España (Reina et al., 2006; Shah et al., 2004), y 10 el genotipo E presente sólo en caprinos italianos (Grego et al., 2007; Reina et al., 2009b; Reina et al., 2009c).

El diagnóstico temprano es una herramienta clave para el control de las enfermedades infecciosas, también en aquéllas por LVPR siempre conducentes a la muerte del animal. El hospedador genera frente al virus una respuesta 15 de anticuerpos indicadora de infección. Éstos se detectan generalmente mediante el empleo de ELISA, aunque su combinación con Western blot (WB) se ha empleado en numerosas publicaciones para establecer el estado 20 infeccioso de un animal (gold estándar) (de Andres et al., 2005; Reina et al., 2009d).

El uso de la PCR o RT-PCR, que detectan directamente provirus y RNA viral respectivamente en células infectadas, ha sido útil como complemento al ELISA ya que permite una 25 detección temprana de la infección así como la posibilidad de detectar animales infectados pero seronegativos (Alvarez et al., 2006; Gonzalez et al., 2005; Herrmann-Hoesing et al., 2007). Esto es posible gracias a la capacidad de los lentivirus de retrotranscribir su genoma en ADN e 30 integrarlo en el genoma de la célula infectada en forma de provirus. Aunque con estas técnicas detectamos directamente la presencia de ácidos nucleicos virales, la enorme variabilidad genética de los LPVR hace que la detección por

PCR no sea siempre posible. La clasificación de los LVPR en cinco grupos genéticos nos da una idea de la variabilidad presente. Por otro lado, aproximadamente tan solo 1 de cada millón de monocitos en circulación se encuentran infectados, así la baja carga proviral o viral, existente con frecuencia, dificulta las posibilidades de encontrar una diana amplificable (de Andres et al., 2005).

Muchos grupos han centrado sus esfuerzos en encontrar un "gold standard" que identifique con certeza los positivos y los negativos para el diagnóstico de LVPR y permita estandarizar las diferentes técnicas serológicas. En ausencia de dicho estándar se ha venido empleando como criterio de infección la positividad a dos técnicas de diagnóstico ya sea serológico o virológico (Varea et al., 2001). A los efectos de esta patente, el término "gold standard", se define como el método de referencia para el diagnóstico de las infecciones de ganado atribuibles a lentivirus, con el que se van a comparar en cuanto a sensibilidad, falsos positivos y falsos negativos, el resto de métodos y kits de diagnóstico existentes en el estado de la técnica.

El diagnóstico serológico de una infección lentiviral presenta algunos inconvenientes. En primer lugar, en estas infecciones la cantidad de antígeno viral que se expone al sistema inmune es variable y frecuentemente bajo, desencadenando respuestas fluctuantes y débiles (de Andres et al., 2005). Por otro lado, pueden pasar varias semanas desde la infección natural hasta la seroconversión (esto es, la aparición de anticuerpos específicos en sangre, detectables por las técnicas serológicas de diagnóstico). Sin embargo, el mayor inconveniente es la diversidad antigenica que presentan los LVPR. Por ejemplo, se ha descrito que antígenos derivados del genotipo A son capaces

de detectar anticuerpos producidos durante la infección por genotipo B, pero no al contrario (Lacerenza et al., 2006). Recientemente, se ha descrito que la seroprevalencia (esto es, la proporción de individuos infectados seropositivos, 5 determinada a partir de los resultados obtenidos mediante los tests de diagnóstico serológico) del genotipo E podría estar subestimada, ya que los ELISAs comerciales empleados en los programas de control no son capaces de detectarlo (Reina et al., 2009d).

10 Existe un gran número de publicaciones que describen diferentes procedimientos ELISA para detectar la infección por LVPR, aunque pocos de estos ensayos han sido validados al nivel internacional. Dichos procedimientos pueden clasificarse en tres grupos, aquéllos que usan como 15 antígeno virus completo, los que usan proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos y los ELISAs competitivos basados en el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) antivirales.

En los ELISAs que utilizan **virus completo** como 20 antígeno, la sensibilidad varía entre 92% y 100% y la especificidad entre 93% y 100%. El virus completo se trata con diferentes agentes químicos para luego tapizar los pocillos y se comparan diferentes tests para relativizar los valores de sensibilidad y especificidad. El único 25 disponible es el Chekit, comercializado por Bommeli AG (Zanoni et al., 1994).

Los tests que utilizan **proteínas recombinantes y/o péptidos** sintéticos abarcan un gran abanico de antígenos, tanto de proteínas del núcleo viral, GAG: p55, p25, p16 y 30 p14; como de proteínas de la envoltura viral, ENV: gp46 (TM) y gp135 (SU). En el caso de péptidos sintéticos, se han sintetizado péptidos de p25, p17 y de TM. La sensibilidad de estos ELISAs varía considerablemente, siendo ésta en

algunos de ellos menor de un 40%, llegando en otros al 100%. La especificidad es siempre elevada. Los ELISAs recombinantes que incluyen antígenos del núcleo viral (GAG) y de la envoltura (ENV) resultan ser equivalentes en sensibilidad y por el contrario algo más específicos (de Andres et al., 2005). Hyphen Biomed comercializa un ELISA recombinante (Elitest) basado en la proteína p25 y un péptido sintético de gp46 (Saman et al., 1999), de elevada sensibilidad y especificidad en algunos estudios (Perez et al., 2009; Saman et al., 1999; Varea et al., 2001), si bien su espectro antigénico podría ampliarse (Ramirez et al., 2009). Por su parte, el Institut Pourquier comercializa un ELISA con formulación equivalente, tapiza los pocillos con las proteínas de fusión p25-gp46, siendo en algunos estudios la sensibilidad de este test alta (Reina et al., 2009d) y en otros limitada (Ramirez et al., 2009). Existen publicaciones adicionales recientes en las que se comparan los tests comerciales existentes en diferentes zonas de Europa (Brinkhof and van Maanen, 2007; Toft et al., 2007).

Los ELISAs **de competición** se basan en la competencia entre los anticuerpos del suero y los anticuerpos monoclonales dirigidos contra las proteínas del virus. Se han obtenido en estos ELISAs valores de sensibilidad y especificidad comparando con WB, de 93% y 100% respectivamente. Comparando los ELISAs de competición con un ELISA de virus completo (Zanoni et al., 1994) se ha obtenido una sensibilidad de 96% y una especificidad del 78% (Fevereiro et al., 1999). Recientemente, se ha descrito un ELISA de competición comercializado por VMRD Inc, presentando una sensibilidad de 100% y una especificidad de 96,4% calculadas empleando 200 muestras de suero de cabra y en relación a radioinmunoensayo (RIPA) (Herrmann et al., 2003). Se conocen muchos otros ELISAs pero no están

diseñados con fines diagnósticos para una gran abanico de estirpes o no muestran datos completos que permitan estimar valores de sensibilidad y especificidad (de Andres et al., 2005; Reina et al., 2009a).

5 La gran mayoría de ELISAs se producen con antígenos de una estirpe concreta de LVPR, lo cual puede dar lugar a una limitada sensibilidad en muestras de campo de distintos orígenes, ya que las estirpes presentes en infecciones naturales pueden diferir mucho de la estirpe patrón. De
10 hecho, un diagnóstico exhaustivo generalizado de la infección por LVPR en sentido amplio requeriría el empleo de técnicas tanto serológicas como virológicas, aumentando la cualificación requerida del personal y el coste del diagnóstico.

15 Alternativamente, desde hace años en el ámbito del diagnóstico de LVPR, se ha propuesto la utilización de ELISAs específicos para estirpes de campo, funcionales por lo tanto en determinadas zonas geográficas (Lacerenza et al., 2006) y prevalece la idea de controlar las estirpes
20 más peligrosas y patógenas de LVPR que aparecen en determinadas áreas geográficas. Así pues, se ha optado en muchos ámbitos por controlar fundamentalmente aquellas estirpes o genotipos presentes en el área de estudio, o aquellas estirpes que presenten verdaderos problemas para
25 la producción y el bienestar animal.

En España, existen al menos tres áreas geográficas con animales infectados por estirpes de campo de LVPR, para las que se carece de una herramienta de detección que presente la sensibilidad y especificidad necesarias. Los LVPR
30 prevalentes en España se han clasificado hasta la fecha en dos grandes grupos. Por un lado, el tipo , virus del Visna (), con secuencias genómicas de los genotipos A y D. Dentro de este grupo se encuentran infecciones Maedi, conducentes

a las formas pulmonar y mamaria de la enfermedad, y el tipo Visna (causante de la forma nerviosa). Por otro lado, el tipo VAEC (causante de la artritis (y encefalitis en cabritos), con secuencias genómicas de tipos B (B1 y B2).

5 Con el fin de identificar antígenos que aumenten la sensibilidad de los métodos existentes en lo que se refiere a estas estirpes españolas, los inventores de la presente solicitud analizaron genomas de LVPRs altamente virulentos pertenecientes a brotes de sintomatología nerviosa y

10 artrítica descritos en las Comunidades Autónomas (CC.AA.) españolas de Castilla y León y Aragón, respectivamente. (Benavides et al., 2006a; Benavides et al., 2006b; Biescas et al., 2005), así como de otros LVPR que infectan individuos seropositivos, pero asintomáticos, hallándose

15 éstos presentes en zonas como , con una baja incidencia de las formas clínicas de la infección (en general, pulmonar y mamaria).

A destacar, que los inventores han sido capaces de sintetizar una serie de nuevos péptidos con capacidad para

20 ayudar al diagnóstico de los animales infectados específicamente por las estirpes virales seleccionadas, aportando así una herramienta útil a la hora de controlar la infección, importar, exportar, reponer o intercambiar animales.

25

Descripción resumida de la invención

Un objeto de la presente invención consiste en un péptido que comprende un fragmento inmunogénico de una estirpe española de un virus LVPR, particularmente de un

30 péptido específico de la estirpe de campo Castellano-Leonesa nerviosa de LVPR de tipo A que comprende la secuencia de amino ácidos representada en SEQ ID No: 8. Péptidos preferidos para la presente invención son aquéllos

que contienen, al menos, 15 aminoácidos. Más particularmente los péptidos de la invención son aquéllos que comprenden alguna de las siguientes secuencias de amino ácidos: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, así como combinaciones de los mismos.

Otro objeto de la presente invención consiste en el uso de alguno de los péptidos que comprenden secuencias seleccionadas entre: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11 o SEQ ID No. 12, o combinaciones de los mismos, para desarrollar tests de diagnóstico in vitro para la infección por LVPR, así como para la elaboración de vacunas contra las infecciones causadas por LVPR.

También un objeto de la invención consiste en composiciones peptídicas que comprenden al menos un péptido que comprende una secuencia de amino ácidos seleccionada entre: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11 o SEQ ID No. 12 y, al menos, otro péptido que comprende una secuencia de amino ácidos a elegir entre: SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 9 o SEQ ID No. 10. Preferentemente, son objeto de la presente invención composiciones peptídicas que comprenden, al menos, dos péptidos que comprenden secuencias de amino ácidos a elegir del grupo definido por: SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9.

Adicionalmente la invención también versa sobre el uso de una composición peptídica como las expuestas anteriormente, para desarrollar tests de diagnóstico in vitro para la infección por LVPR, así como para la elaboración de vacunas contra las infecciones causadas por LVPR.

Otro objeto relacionado también con el concepto

inventivo único de la presente invención es un ácido nucleico que codifica un péptido que comprenda al menos una de las secuencias de amino ácidos seleccionadas entre: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11 o SEQ ID No. 12.

La invención también consiste en un anticuerpo, monoclonal o policlonal, que se une específicamente a un péptido según lo descrito con anterioridad, así como el uso 10 de dicho anticuerpo, para desarrollar tests de diagnóstico in vitro para la infección por LVPR, así como para la elaboración de vacunas contra las infecciones causadas por LVPR.

La invención también comprende un método y su 15 aplicación en un kit que permite la detección in vitro de una infección por alguna estirpe española (o genéticamente muy próxima) del virus LVPR de los tipos filogenéticos A y B, que comprende la unión específica entre un anticuerpo y un péptido de la invención. Preferentemente, en dicho 20 método de la invención se emplea proteína G o al menos un segundo anticuerpo capaz de unirse específicamente al primer anticuerpo (que reacciona con un péptido comprendido en las composiciones peptídicas de la invención detalladas más arriba). Asimismo, dicho método de la invención también 25 puede emplear un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un péptido codificado por un ácido nucleico según la invención, mencionado anteriormente.

Dentro de las aplicaciones de la presente invención se encuentra también el uso de un péptido; de una composición 30 peptídica; de un ácido nucleico; o de un anticuerpo según lo expuesto antes, para aumentar la sensibilidad de un test comercial de diagnóstico in vitro de la infección por LVPR.

El kit según la invención comprende un soporte sólido

y, preferentemente, comprende al menos uno de los péptidos que comprende al menos una de las secuencias de amino ácidos seleccionadas entre: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12, o combinaciones de dichos péptidos. Asimismo, el kit de la invención puede comprender también una composición peptídica de las detalladas anteriormente.

10 **Descripción de las figuras**

FIG 1. Alineamiento de secuencias disponibles en GenBank y localización de la secuencia del Péptido 98M. En dicha secuencia figuran en sombreado los aminoácidos diferentes de los presentes en la estirpe islandesa Kv1514 causante de visna. Aparece encuadrada la región hidrofílica-antigénica. Asimismo, se señala con una flecha el inicio del antígeno de esta zona elegido por Mordasini et al. (2006) con fines diagnósticos, y las regiones variables de esta proteína, V5 y V4 (Hotzel et al., 2002).

20 **Fig. 2.** Representación gráfica ilustrativa de los patrones de reactividad de los péptidos. En el borde de cada triángulo se indica el péptido en estudio y en su interior el número de sueros con que reacciona dicho péptido. En las áreas de solapamiento entre triángulos se indica el número de sueros que reaccionan con los distintos péptidos comprendidos en dicha área; y en aquéllas sin solapamiento figura el número de sueros que reacciona con el péptido en cuestión. Las áreas no son proporcionales al número de sueros que reaccionan. Se entiende que un suero reacciona con un péptido cuando en pruebas de ELISA se generan valores de absorbancia por encima de un valor establecido como umbral o "cut off". En la figura se han distribuido los sueros según la procedencia de los mismos y

las características de las correspondientes estirpes infectivas: (2A) brote visna de Castilla y León, total n = 16 (VMV de tipo Visna, grupo genético A); (2B) brote artrítico de Aragón, total n = 8 (de tipo VAEC, grupo genético B); y (2C) Navarra, total n = 104, de los que 93 resultaron positivos a los péptidos (tipo genético de virus, mixto).

Fig. 3. Representación gráfica ilustrando el solapamiento de reactividades de los péptidos seleccionados, así como su reactividad global en los grupos de sueros Elitest+ Chekit+ (3A), Elitest+ Chekit- (3B), Elitest- Chekit+ (3C), Elitest- Chekit- (3D). Cada triángulo representa el conjunto de reacciones positivas correspondientes a un péptido. Las áreas no son proporcionales al número de reacciones indicado en cada subárea. (3A) Sueros que resultaron Elitest + y Chekit + (n = 81); total positivos detectados por la combinación de péptidos, 80 de 81. (3B) Sueros que resultaron Elitest + y Chekit - (n = 4); total positivos detectados por la combinación de péptidos, 4 de 4. (3C) Sueros que resultaron Elitest - y Chekit + (n = 27); total positivos detectados por la combinación de péptidos, 21 de 27. (3D) Sueros que resultaron Elitest - y Chekit- (n = 16); total positivos detectados por la combinación de péptidos, 14 de 16.

25

Descripción detallada de la invención.

Los péptidos objeto de la presente invención fueron obtenidos gracias al análisis de las secuencias virales presentes en los brotes regionales de las diferentes CC.AA. 30 españolas. Tras obtener la secuencia de aminoácidos deducidos de fragmentos específicos del genoma viral y seleccionar dichos fragmentos en función de su capacidad antigénica potencial, se sintetizaron los correspondientes

péptidos y emplearon como antígenos en ELISAs utilizando sueros de animales infectados para verificar la sensibilidad y especificidad de dichos péptidos en la detección de la infección por parte de dichas estirpes.

5 La elección de cada péptido requirió un estudio *a priori* que permitiera conocer las secuencias de LVPR presentes en distintos LVPR españoles . Históricamente, las enfermedades asociadas a infecciones por LVPR en España han sido artritis en cabras, y mastitis o disnea (enfermedad 10 pulmonar) en ovejas, pero como brotes de enfermedad (clínica) sólo han aparecido los brotes nervioso y artrítico antes mencionados.

Las dos regiones del genoma viral que codifican proteínas estructurales de reconocidas propiedades 15 antigenicas son *gag* (que codifica las proteínas GAG de matriz, MA o p17; cápside CA o p25; y nucleocápside NC o p14) y *env*, que codifica las proteínas de la envoltura ENV del virus correspondientes tanto a la superficie (SU o gp135) como a la transmembrana (TM o gp46). Teniendo esto 20 en cuenta, se determinaron las regiones hidrofílicas con los algoritmos propuestos por Hoop y Woods (1981) y Kyte y Doolittle (1982) y los determinantes antigenicos con el de Kolaskar y Tongaonkar (1990) con ayuda del software correspondiente (ExPASy Proteomics Server: 25 <http://www.expasy.ch/>). Los péptidos se eligieron de modo que permitieran potencialmente detectar, según la información que se obtuvo a partir de PCR-secuenciación, infecciones debidas a: a) la estirpe causante del brote nervioso de la C.A. de Castilla y León (de tipo visna-León); b) la estirpe causante del brote articular de la C.A. de Aragón; y c) en general, estirpes de distintos tipos orígenes causantes de formas típicas de LVPR procedentes de pequeños rumiantes.

Los resultados indican que los nuevos péptidos son capaces de incrementar la sensibilidad de detección en los animales infectados por las estirpes de campo españolas mencionadas. Por lo tanto, el primer objeto de la presente invención es un péptido aislado que comprende un fragmento inmunogénico de una estirpe española del virus LVPR A del brote nervioso.

En el contexto de la presente invención, tanto la expresión "virus LVPR" como el acrónimo "LVPR" se refieren a aquellos lentivirus que infectan característicamente pequeños rumiantes, como por ejemplo el ganado ovino y caprino. Esta expresión incluye específicamente, pero sin que ello sea limitante, el virus Maedi Visna (VMV), el de la artritis encefalitis caprina (VAEC) y todos sus subtipos y estirpes.

Así, en una realización preferente, el péptido de la presente invención se caracteriza porque es específico de la estirpe de campo Castellano-Leonesa A nerviosa de LVPR.

La presente invención proporciona estos péptidos que son útiles para detectar diferencialmente estirpes del brote nervioso visna (grupo genético A) frente a las del brote artrítico (grupo genético B), diferencia que pasa desapercibida cuando se utilizan otros métodos serológicos conocidos.

Una vez se hubieron identificado y seleccionado las regiones hidrofílicas-antigénicas, se diseñaron y sintetizaron los 96 péptidos correspondientes para el estudio, que se hallaban distribuidos entre distintas proteínas GAG y ENV del virus, según se resume en la Tabla 1.

Tabla 1.- Número de péptidos elegidos por proteína viral

Péptidos	Proteínas virales					Total
	Gag-p14	Gag-p17	Gag-p25	Env-SU	Env-TM	
De 15 aminoácidos	7	13	11	8	21	60
De 8 aminoácidos	0	7	10	2	17	36
Total	7	20	21	10	38	96

De éstos, se seleccionaron 12 péptidos por su mayor reactividad (Tabla 2): 4 péptidos de reactividad media (23-31%), 2 de reactividad alta (46-47%) y 6 de reactividad muy elevada (57-62%). Todos los péptidos seleccionados tenían 15 aminoácidos. Por lo tanto, en una realización preferente, el péptido de la invención está compuesto por al menos 15 aminoácidos.

10

Tabla 2. Reactividad de los péptidos de la invención frente a sueros de animales infectados por LVPR en los correspondientes ELISAs*

Reactividad (%)	Péptido/ proteína vírica	Numeración
Media (23-31%)	75/ GAGp14	SEQ ID No. 1
	76/ GAGp14	SEQ ID No. 2
	91/ ENVgp135	SEQ ID No. 3
	157/ ENVgp46	SEQ ID No. 4
Alta (46-47%)	48/ GAGp25	SEQ ID No. 5
	81/ GAGp14	SEQ ID No. 6
Muy alta (57-62%)	77.M/ GAGp14	SEQ ID No. 7
	98.M/ ENVgp135	SEQ ID No. 8
	126.M1/ ENVgp135	SEQ ID No. 9
	126.M2/ ENVgp135	SEQ ID No. 10
	139/ ENVgp46	SEQ ID No. 11
	140/ ENVgp46	SEQ ID No. 12

*Testados con 128 sueros, siendo 112 (87,5%) de animales infectados, según Elitest® y/o Chekit®.

Ninguno de estos péptidos pertenecía a la proteína de la matriz del virus (MA), pero sí a las proteínas de superficie (SU), transmembrana (TM), nucleocápside (NC) y cápside (CA). De los 12 péptidos, 9 de los péptidos seleccionados no habían sido descritos con anterioridad en el campo de la técnica. Por lo tanto, una realización preferente de la presente invención es un péptido que comprende un fragmento inmunogénico de una estirpe española del virus LVPR a elegir del grupo que comprende los péptidos de SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 y combinaciones de estos.

A resaltar que 3 de los 12 péptidos seleccionados (SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 9 y SEQ ID no. 10) resultaron no ser específicos para las cepas españolas, ya que también se unían a sueros procedentes de animales de diversos orígenes de fuera de España. Estos 3 péptidos, a pesar de no ser específicos, demostraron su utilidad en el incremento de la sensibilidad diagnóstica para sueros provenientes de algunas de las regiones españolas analizadas. Por tanto, otro aspecto de la presente invención es el uso de alguno de los péptidos de SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 o combinaciones de los mismos, a su vez en combinación con alguno de los péptidos no específicos de estirpes españolas, seleccionados entre SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 9 y SEQ ID no. 10, en la fabricación de un test/kit/dispositivo de diagnóstico de la infección por LVPR.

Se comprobó que alguno de estos péptidos era particularmente reactivo a sueros procedentes de regiones geográficas españolas específicas. Según esto, una realización preferente de la presente invención es un

péptido específico de la estirpe de campo Castellano-Leonesa A nerviosa caracterizado por la secuencia de aminoácidos SEQ ID No. 8. Sin embargo, en las regiones de Aragón, Navarra y País Vasco, la sensibilidad incrementaba, 5 no en función de un solo péptido, sino de una combinación de péptidos seleccionados. Por tanto, otro objeto de la presente invención es una composición peptídica que comprende al menos un péptido de la invención y al menos otro péptido a elegir entre SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 9 o SEQ 10 ID No 10 y sus combinaciones. Para aumentar la sensibilidad frente a estirpes características de Aragón, Navarra o el País Vasco, dicha composición comprende preferentemente al menos dos péptidos a elegir del grupo definido por SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9 y 15 combinaciones de los mismos.

Un segundo objeto de la presente invención proporciona un anticuerpo, monoclonal o policlonal, obtenido del suero de un animal inmunizado con una preparación sustancialmente pura que comprende al menos un péptido con una secuencia de 20 amino ácidos a elegir entre: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11 o SEQ ID No. 12, o combinaciones de los mismos. Una combinación inmunogénica puede ser así mismo una composición peptídica como las descritas 25 previamente para esta invención, que incluya al menos un péptido que comprende una secuencia de amino ácidos a elegir entre: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11 o SEQ ID No. 12 y al menos otro péptido que 30 comprende una secuencia de amino ácidos a elegir entre: SEQ ID No. 6, SEQ ID No. 9 y SEQ ID No. 10.

Los anticuerpos se obtienen usando como inmunógeno al menos un péptido de la presente invención o al menos una

proteína de fusión que incluya al menos un fragmento de al menos un péptido de la presente invención. Dichas proteínas de fusión pueden contener una proteína (sintética o producida en sistema bacteriano o eucariota) o porción de la misma, fusionada a uno o varios péptidos de la presente invención. Las inmunoglobulinas (Abs) que se producen usando los péptidos de la presente invención, tienen, entre otras propiedades, la capacidad de unirse específicamente y/o producir la inmunoprecipitación de (o de unirse a) una proteína de LVPR que puede estar presente en una muestra (biológica o de otro origen) o una solución derivada de dicha muestra biológica. Dichos anticuerpos también se pueden usar para aislar selectivamente estirpes virales que expresan las proteínas para las que son específicos los anticuerpos.

Los anticuerpos, monoclonales o policlonales, específicos para los péptidos de la presente invención, se pueden preparar empleando técnicas estándar, conocidas por los expertos en la técnica, que usan las proteínas virales o porciones de las mismas como antígenos [véase, por ejemplo, Bahouth y col., (1991) Trends Pharmacol. Sci. 12: 338-343; Current Protocols in Molecular Biology (Ausbel y col., eds.) John Wiley y Sons, Nueva York (1984)].

La disponibilidad de los anticuerpos específicos de estas estirpes hace posible la aplicación de la técnica de inmunohistoquímica para controlar la distribución y propagación de, al menos, las estirpes específicas de Castilla- León, Aragón y Navarra. Dichos anticuerpos se podrían también emplear en diagnóstico y aplicaciones terapéuticas, tipo vacunas. Los anticuerpos se pueden administrar a un animal empleando procedimientos estándar, tales como por ejemplo, mediante inyección intraperitoneal, intramuscular, intravenosa o subcutánea, implante o formas

transdérmicas de administración y similares. Un experto en la técnica puede determinar empíricamente las formas de dosis, regímenes de tratamiento, etc., dependiendo de la forma de administración empleada.

5 Previamente a la selección de los péptidos de la invención, se procedió a la amplificación y secuenciación completa del genoma de dos aislados de LVPR a partir de estirpes españolas, concretamente la estirpe del brote artrítico de Aragón, 496 (Glaria et al., 2009), y a la
10 estirpe del brote nerviosos de Castilla-León, 697; Glaria et al., en preparación) y se eligieron segmentos del genoma vírico de potencial interés diagnóstico, correspondientes a las regiones LTR, *gag*, *pol* y *env* del genoma viral. Los resultados demostraron que los segmentos seleccionados
15 codificaban péptidos específicos de las estirpes españolas. Por tanto, otro objeto de la presente invención es un ácido nucleico aislado que codifica un péptido inmunogénico de una estirpe española del virus LVPR a elegir entre los subtipos filogenéticos B2 artrítica, A pulmonar o A2
20 nerviosa, preferiblemente cualquiera de los péptidos descritos en las SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 y combinaciones de estos. Suplementariamente, el ácido nucleico de la presente
25 invención codifica los péptidos descritos por la SEQ ID No 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 12 y combinaciones de éstos.

Previamente al aislamiento del ácido nucleico, se procedió a la elección de cebadores PCR (entre ellos los empleados por el grupo de trabajo para la amplificación de 30 genomas de LVPR españoles; Tabla 3) para la amplificación y estudio de los segmentos de ácido nucleico seleccionados. Gracias a ello se pudo realizar un estudio comparativo de secuencias, empleando tanto las obtenidas en este estudio a

partir de ovinos españoles infectados, como las disponibles en GenBank (Fig. 1) que incluyen, entre otras, "secuencias tipo" tanto de la estirpe EV1 del VMV como de origen español representativas de los brotes nervioso (Castilla-León) y artrítico (Aragón).

Además, la presente invención proporciona también un procedimiento para la detección de la infección por alguna estirpe española del virus LVPR de los subtipos filogenéticos B2 artrítica, A nerviosa que comprende la 10 unión entre un anticuerpo, y un péptido de la presente invención, codificado por un ácido nucleico de la presente invención. Otro procedimiento proporcionado por la presente invención, es específico para aumentar la sensibilidad de 15 un test diagnóstico para la infección por LVPR y comprende la utilización de una composición peptídica de la presente invención.

Tabla 3. Cebadores diseñados para amplificación de genomas de LVPR españoles (véase Glaria et al., 2009).

Designación	Secuencias		Localización respecto de la estirpe	PCR
			B Co	
env-LTR				
env-CAEV2	SEQ ID No. 13	Fw	8752-8777	1
Gag				
Gag Cen LVPR	SEQ ID No. 14	Rv	1134-1115	1
Wie5	SEQ ID No. 15	Fw	1034-1053	1
Gag Fin LVPR	SEQ ID No. 16	Rv	2018-1996	1
Gag-Pol				
496 VRC	SEQ ID No. 17	Fw	1568-1588	2
Pol I				
Pol I LVPR	SEQ ID No. 18	Fw	2705-2728	1
Pol II LVPR	SEQ ID No. 19	Rv	3863-3844	1
Pol III				
Pol II LVPR	SEQ ID No. 20	Fw	4784-4804	1
TAT LVPR	SEQ ID No. 21	Rv	5934-5912	1
Env I				
5084	SEQ ID No. 22	Fw	5808-5826	1
SU 1 LVPR	SEQ ID No. 23	Rv	6736-6714	1
Env II				
SU 2 LVPR	SEQ ID No. 24	Fw	6579-6601	1
567	SEQ ID No. 25	Rv	7511-7488	1
Env III				
SU 3 LVPR	SEQ ID No. 26	Fw	7381-7402	1
TM 1 LVPR	SEQ ID No. 27	Rv	8134-8116	1
Env IV				
TM2 LVPR	SEQ ID No. 28	Fw	8086-8105	1
LTR LVPR	SEQ ID No. 29	Rv	9001-8980	1
Env Adicionales				
LVPR	SEQ ID No. 30	Fw	6474-6493	1
566 Fw	SEQ ID No. 31	Rv	7803-7822	1
TM3 LVPR Rv	SEQ ID No. 32	Fw	7954-7935	1
TM4 LVPR	SEQ ID No. 33	Fw	8016-8037	1

Orientación: Fw: sentido y Rv: antisentido.

Usado en una primera (1) o segunda (2) PCR.

Preferentemente, estos procedimientos comprenden además, la utilización de un soporte sólido caracterizado porque dicho soporte comprende al menos un péptido de la invención. Más preferentemente, al menos uno de dichos

péptidos se elige del grupo que comprende los péptidos de SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 y combinaciones de estos.

5 La presente invención tiene igualmente por objeto proporcionar un conjunto de reactivos o kit para la detección de infección por LVPR que comprende al menos un péptido, un anticuerpo o un ácido nucleico de la presente invención. Dicho kit es también de utilidad en el 10 pronóstico de la evolución de la infección, su seguimiento o el seguimiento de una terapia específica contra la enfermedad y puede ser complementario a otros kits existentes en el estado de la técnica, aumentando su sensibilidad.

15 Preferiblemente, el Kit de la invención comprende un soporte sólido caracterizado porque dicho soporte comprende al menos uno de los péptidos de la invención, preferiblemente uno a elegir del grupo definido por SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 20 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 y combinaciones de estos.

El kit de la invención puede comprender asimismo un anticuerpo de la invención, es decir un anticuerpo específico contra alguno de los péptidos de SEQ ID No. 1, 25 SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11, SEQ ID No. 12 y combinaciones de estos.

Además, el kit puede comprender un segundo anticuerpo o anticuerpo secundario, preferiblemente capaz de unirse a 30 las regiones constantes (Fc) de los anticuerpos de cabra y oveja o bien una proteína bacteriana con la misma función como por ejemplo la proteína A, la proteína G o sus quimeras. Preferiblemente, el segundo anticuerpo o la

proteína bacteriana estará unido a otra sustancia o partícula, que puede ser una sustancia que facilite su detección, bien directamente, bien mediante la adición de un sustrato para una reacción enzimática, o bien una sustancia o partícula que facilite la extracción del anticuerpo del medio en el que se encuentre.

Cuando el kit comprenda un ácido nucleico de la invención, éste se podrá utilizar para hibridar muestras de tejido o fluidos biológicos obtenidas de animales infectados y analizarlas mediante PCR. El kit puede contener además otros reactivos necesarios para llevar a cabo las reacciones PCR o las hibridaciones así como su detección. Estos reactivos incluyen anticuerpos secundarios marcados, polimerasas, enzimas de restricción, sales y soluciones tampón etc.

Los siguientes ejemplos reflejan una realización no limitante de la invención, que contribuirá a facilitar su comprensión con más detalle. En una 1^a etapa se hace un análisis preliminar para seleccionar un primer grupo amplio de péptidos (Ejemplos 1-10) para, a continuación, desarrollar métodos de diagnóstico in vitro y kits para llevarlos a cabo centrados en un grupo más específico de péptidos, seleccionado a partir del grupo inicial (Ejemplos 11-14).

25

Ejemplo 1: Identificación y síntesis de péptidos antigenicos

La elección de los péptidos requirió un estudio a priori que permitiera conocer las secuencias de LVPR presentes en distintos brotes de LVPR españoles: nervioso y artrítico. Para ello, en primer lugar, se procedió al diseño de cebadores PCR, amplificación y estudio de segmentos del genoma vírico de potencial interés

diagnóstico, correspondientes a las regiones LTR (situadas a ambos extremos del provirus y que contienen las secuencias nucleotídicas implicadas en la regulación de la transcripción), *gag* (codifica las proteínas del núcleo viral: Matriz -MA, Cápside -CA y Nucleocápside -NC), *pol* (codifica las enzimas implicadas en la replicación e integración viral: Retrotranscriptasa -RT, Proteasa -PR, Integrasa -INT y Desoxiuridín-trifosfatasa -dUTPasa) y *env* (codifica las glicoproteínas de la envoltura viral: de Superficie -SU y Transmembrana -TM) del genoma viral de Lentivirus, lográndose la amplificación y secuenciación completa del genoma de dos aislados de LVPR a partir de estirpes españolas.

A continuación, tras la amplificación, se realizó un estudio comparativo de secuencias, empleando tanto las obtenidas en este estudio a partir de ovinos españoles infectados, como las disponibles en GenBank (Fig. 1) que incluyen, entre otras, secuencias tipo, tanto de la estirpe EV1 (Sargan et al., 1991) del VMV como de origen español representativas de los brotes nervioso (Castilla-León; Glaria et al., en preparación) y artrítico (Aragón) (Gloria et al., 2009).

Se eligieron un total de 96 péptidos de modo que permitieran potencialmente detectar, según la información que obtuvimos a partir de PCR-secuenciación, infecciones por: a) la estirpe causante del brote nervioso de la C.A. de Castilla y León (de tipo visna-León); b) la estirpe causante del brote articular de Aragón; y c) infecciones por LVPR en general, de tipo VMV o de tipo VAEC, en particular.

Síntesis peptídica.- La síntesis de los 96 péptidos se encargó a una empresa (Thermo Scientific) para su uso en las etapas subsiguientes del proyecto.

Ejemplo 2: Animales y sueros empleados en el estudio comparativo de los péptidos sintéticos.

En una primera fase del estudio se estudiaron comparativamente los ELISAs de los 96 péptidos empleando un panel de muestras de suero de 127 ovinos españoles. De ellos, 111 de distintas procedencias eran positivos a LVPR según ambos ELISAs comerciales (Chekit y/o Elitest): 16 del brote visna de la C.A. de Castilla y León (de tipo genético VMV A), 7 del brote artrítico de la C.A. Aragón (de tipo genético VAEC B2) y 88 de distintas zonas de la C.F. de Navarra, de los que 68 pertenecieron a animales ubicados en Navarra y elegidos por el Centro de Inseminación Artificial de Oskotz (Gobierno de Navarra). Los 16 sueros restantes procedían de animales de Navarra que dieron resultados seronegativos en dichos tests comerciales. Como sueros control negativo se emplearon los procedentes de 6 animales españoles, seronegativos a los dos tests ELISA comerciales (Chekit y Elitest) y a los 12 péptidos que fueron elegidos para una segunda etapa de este estudio (según se describe más adelante) y de un animal adicional, procedente de Islandia (país libre de infección por LVPR). En total 7 sueros negativos control. También se emplearon 32 sueros procedentes del Reino Unido para un conjunto de péptidos ($n=9$) perteneciente al grupo de los ($n=12$) elegidos para una segunda etapa de este estudio (al ser procedentes de rebaños supuestamente seronegativos), con el fin de averiguar si alguno de los péptidos detectaba seropositividad en estos sueros, pero sin que formaran parte integrante de la batería de sueros en el análisis comparativo. Con lo que la batería de sueros finalmente constaba de 128 sueros, de los que 112 eran positivos a ELISAs comerciales.

En una segunda fase de estudio en la que se estudiaron comparativamente 5 de los 96 péptidos, se emplearon los sueros procedentes de 535 ovinos de los siguientes rebaños y áreas geográficas:

- 5 • **TMA**: Este rebaño (**157** sueros obtenidos) se encuentra en la **C.A. de Castilla y León (León)**, donde la forma clínica en la infección por VMV afecta al sistema nervioso central (forma nerviosa).
- 10 • **ART**: Este rebaño (**118** sueros obtenidos) se encuentra en **Aragón (Zaragoza)**, donde la forma clínica en la infección por VMV afecta a las articulaciones (forma artrítica).
- 15 • **CHA**: Este rebaño (**60** sueros obtenidos) se encuentra en **Aragón (Zaragoza)**, ha sido saneado de Maedi Visna empleando Elitest.
- 20 • **RMU**: Este rebaño (**50** sueros obtenidos) se encuentra en **el País Vasco (Vizcaya)**, ha sido saneado de Maedi Visna empleando Elitest.
- 25 • **MLA**: Este rebaño (**50** sueros obtenidos) se encuentra en **el País Vasco (Guipúzcoa)**, se estima de muy baja prevalencia al Maedi Visna según Elitest, con supuesta resistencia natural a LVPR puesto que dicho rebaño jamás ha sido objeto de ningún plan de control.
- 26 • **OSK**: Este conjunto de animales ubicados en **Navarra** (**58** sueros obtenidos de animales con distintos orígenes) ha sido suministrado por el Centro de Inseminación de Navarra.

• **CLI**: Se trata de un conjunto de animales, no incluidos en los grupos anteriores (**42** sueros) con sintomatología **clínica nerviosa**, de **León** (n= 31; brote nervioso); o **artrítica** de **Zaragoza** (n= 11; brote 5 artrítico).

• **REP**: grupo de sueros representativos. Con el fin de ilustrar los distintos patrones de reacción observados en los ELISAs de péptidos generados, se ha realizado este estudio, que incluye el suero de un animal **representativo** 10 de cada una las distintas formas de Maedi Visna (pulmonar, articular, nerviosa), así como sueros frente a antígenos de los **tipos** VAEC B1 y B2.

Ejemplo 3: Determinación del valor umbral en cada uno de 15 los nuevos ELISAs peptídicos

Para realizar los tests enfocados hacia la determinación del valor umbral, dispusimos de 135 muestras de suero de ovinos y caprinos (cuyo estatus infectado/no infectado había sido determinado en laboratorios de otros 20 países que trabajan en diagnóstico de LVPR). De ellos, 40 procedían de Italia, 42 de Islandia y 53 de Reino Unido. Todos estos sueros eran supuestamente negativos a los tests de diagnóstico comerciales y, algunos, también a PCR. Dichos sueros supuestamente negativos se emplearon para 25 determinar el umbral, o valor cut-off, de positividad para el ELISA correspondiente a cada uno de los péptidos estudiados. El umbral es el valor a partir del cual un suero debe considerarse positivo en el ELISA correspondiente.

En la primera fase del estudio, el valor umbral se estableció en 0,35 para el ELISA de los 96 péptidos, valor muy cercano al fijado por Mordasini y colaboradores (2006), 30

de 0,3 para distintos ELISAs de péptidos. En una segunda fase de estudio, en la que se analizaron en mayor profundidad 5 ELISAs de péptidos, el valor umbral se obtuvo sumando a la media de las absorbancias obtenidas de los sueros negativos, tres veces la desviación estándar obtenida con ellos. A continuación se indica el valor umbral obtenido para cada uno de los 5 nuevos ELISAs (cuyo nombre coincide con el del péptido que se emplea para el tapizado), a saber, para ELISA-91: 0,4; ELISA-98M: 0,32; ELISA-126M1: 0,29; ELISA-126M2: 0,25; ELISA-139: 0,22.

ELISAs comerciales.- Se emplearon dos tests comerciales, Elitest® (Hyphen-Biomed, Francia) y Chekit® (AG- Chekit CAEV/MVV Antibody test kit (IDEXX Switzerland AG, Liebefeld, Bern, Switzerland), de acuerdo con las instrucciones de los correspondientes fabricantes.

Western blot.- Se realizó la técnica siguiendo el protocolo previamente descrito (Ramirez et al., 2009).

Análisis estadístico.- El análisis de la eficacia del nuevo ELISA se llevó a cabo comparándolo con los ELISAs comerciales, realizando las estimaciones de concordancia entre tests (estadístico kappa ± error estándar, $\kappa \pm ES$; e intervalos de confianza, IC, del 95% para dicho estadístico, según el procedimiento descrito por Landis y Koch, 1977. La positividad a al menos dos tests que permitan la detección de infección fue considerada el criterio de positividad (gold standard), aplicándose por ello western blotting en sueros que proporcionaron resultados discordantes al realizar las comparaciones entre tests. Asimismo, la sensibilidad y la especificidad para dicho ELISA se determinaron mediante Win Episcope 2.0

(<http://www.clive.ed.ac.uk/winepiscope/>) al realizar las comparaciones con Elitest, Chekit y "Gold standard".

Ejemplo 4: Estudio de reactividad por grupos de péptidos

En la Tabla 4 se resumen los resultados (porcentajes de sueros reactivos) obtenidos en el análisis de los ELISAs de los 96 péptidos tras enfrentarlos a la batería constituida por 128 sueros (112 positivos a tests comerciales). Los 36 péptidos con una longitud de 8 aminoácidos mostraron una reactividad baja, detectando muy pocos animales seropositivos (<9%). Por otro lado, cuando se estudiaron los péptidos de 15 aminoácidos, se observó asimismo en 33 de ellos igualmente una reactividad baja (<9%), y en otros 15 péptidos una reactividad moderada (9-20%). Así, considerando que la gran mayoría de sueros positivos no eran detectados por estos 84 péptidos y observándose que ninguno de estos péptidos presentó una reactividad coherente con un tipo genético concreto, se consideraron no aptos para su empleo en tests de diagnóstico. Sin embargo, se encontraron 12 péptidos (los restantes hasta los 96 analizados) con una mayor reactividad, que fueron considerados aptos para la segunda etapa de este estudio por la posibilidad de emplearlos en tests de diagnóstico serológico. Se trataba de 4 péptidos de reactividad media (23-31%), 2 de reactividad alta (46-47%) y 6 de reactividad muy elevada (57-62%) según se señala en las Tablas 2 y 4. Curiosamente, ninguno de estos péptidos aptos pertenecía a la proteína de la matriz del virus (MA), pero sí a las proteínas SU, TM, NC y CA. Con estos 12 péptidos se prosiguió con el análisis comparativo en mayor profundidad.

Tabla 4. Porcentajes de los sueros integrantes de la batería constituida (128 de los que 112 procedían de animales infectados) que resultaron reactivos frente a los distintos péptidos analizados (96) en los correspondientes ELISAs subunidad.

Tipo de péptido	Reactividad (%)	Criterio para su uso	Especificaciones: Péptido/proteína vírica-secuencia (fuente)
De 8 aminoácidos 36 péptidos ^a	Baja (<9%)	No aptos	
De 15 aminoácidos 33 péptidos ^{a/b} 15 péptidos ^{a/b} 4 péptidos ^b	Baja Moderada Media (9-20%) (23-31%)	No aptos No aptos De interés	75/GAGp14 (SEQ ID No: 1) 76/GAGp14 (SEQ ID No: 2) 91/ENVgp135 (SEQ ID No: 3) 157/ENVgp46 (SEQ ID No: 4) 48/GAGp25 (SEQ ID No: 5) 81/GAGp14 (SEQ ID No: 6) 77.M/GAGp14 (SEQ ID No: 7) 98.M/ENVgp135 (SEQ ID No: 8) 126.M1/ENVgp135 (SEQ ID No: 9) 126.M2/ENVgp135 (SEQ ID No: 10) 139/ENVgp46 (SEQ ID No: 11) 140/ENVgp46 (SEQ ID No: 12)
2 péptidos ^b	Alta (46-47%)	De interés	
6 péptidos ^b	Muy alta (57-62%)	De interés	

^a Testados con 111 sueros, siendo 95 (85,6%) de animales infectados, según Elitest® y/o Chekit®.

^b Testados con 128 sueros, siendo 112 (87,5%) de animales infectados, según Elitest® y/o Chekit®.

Ejemplo 5: Primer estudio preliminar sobre la posible especificidad de los péptidos para la detección de sueros de animales infectados con distintos tipos genéticos de virus.

Se obtuvieron muestras sanguíneas de animales procedentes de las regiones de interés (C.A. Castilla-

León, C. A. Aragón y Navarra), se aisló el DNA para estudiar las secuencias provirales, se realizaron PCRs para las regiones LTR y *gag* (p25-p17), se clonaron los amplicones y se procedió a la secuenciación de los 5 correspondientes provirus en dichas regiones en un total de 28 animales, encontrándose que 16 de ellos, los del brote visna de Castilla y León, eran de tipo VMV (A) y los restantes 12 (4 de Navarra, 7 de un brote articular encontrado en Aragón y un suero mejicano) eran de tipo VAEC 10 (tipo B). Así, en este sondeo preliminar de especificidades decidimos enfrentar a los 28 sueros, clasificados en las correspondientes categorías media, alta y muy alta, que deberían contener anticuerpos frente a antígenos A (16) o B (12), con los 12 péptidos seleccionados, cada uno de ellos 15 clasificado según el tipo de secuencia que se empleó para su diseño (de tipos VMV y VAEC). Como control negativo, también se analizaron con estos péptidos los 32 sueros procedentes de rebaños del Reino Unido, supuestamente seronegativos.

20 Los resultados se muestran en la Tabla 5, encontrándose que la tendencia de los péptidos al reaccionar con los sueros fue la esperada: los péptidos de tipo VMV tendían a reaccionar con mayor frecuencia con los sueros de especificidad de tipo VMV y los de tipo VAEC con 25 los sueros de especificidad VAEC, a excepción del péptido 75/NC. Una explicación al comportamiento del péptido 75/NC, que siendo considerado originalmente de tipo VMV reaccionaba más con sueros VAEC, sería que dicho péptido presentaba aminoácidos variables en 6 posiciones y pudieron escogerse finalmente para su síntesis secuencias más afines 30 a epitopos VAEC que a epitopos VMV. Por todo ello, verificaremos más adelante si se trata de un péptido de tipo VAEC.

Tabla 5. Porcentaje de reactividad frente a 12 péptidos de sueros procedentes de animales infectados procedentes de Castilla y León, Aragón, Navarra y Reino Unido, cuya secuencia genética LVPR se ha determinado.

Péptido (reactividad con los sueros del conjunto de zonas geográficas)	Tipo de Secuencia de los péptidos	Porcentaje de sueros de Castilla- León reactivos (n=16, tipo visna, VMV A)	Porcentaje sueros Aragón Navarra reactivos (n=12, tipo VAEC, B)	Porcentaje de sueros de UK reactivos (n=32, tipo no estudiado)
75/NC (media)	VMV	13	42	47
76/NC (media)	VAEC	38	42	31
91/SU (media)	LVPR	31	33	25
157/TM (media)	VMV	44	33	No testado
48/CA (alta)	VMV	50	50	69
81/NC (alta)	VMV	50	33	97
77.M/NC (muy alta)	VMV	56	50	No testado
98.M/SU (muy alta)	Visna	94	42	No testado
126.M1/TM (muy alta)	VAEC	75	92	22
126.M2/TM (muy alta)	VMV	94	92	9
139/TM (muy alta)	VMV	94	92	16
140/TM (muy alta)	VAEC	88	100	34
Elitest (comercial)	VMV	100	100	6
Chekit (comercial)	VMV	88	92	3

Ejemplo 6: Reactividad de cada péptido, tomando como referencia la obtenida en tests comerciales Elitest y Chekit: estudio comparativo según el origen de los sueros estudiados.

5 Como antígenos para este estudio, los 12 péptidos con reactividad media o muy alta se agruparon según su diseño original en tipos VAEC, VMV y LVPR en general. También se emplearon los antígenos comerciales correspondientes a Elitest y Chekit, empleándose éstos como control. Por otro 10 lado, los sueros a testar se agruparon según su origen geográfico: Castilla y León (capaces de detectar antígenos A, de tipo VMV visna); Aragón (capaces de detectar antígenos de tipo VAEC B2) y Navarra, sueros problema en los que se esperaba la existencia de una heterogeneidad en 15 cuanto a los tipos genéticos y antigénicos.

Según se indica en la Tabla 6, la reacción positiva en los sueros de Castilla y León se detectó empleando como control Chekit (100%) y los péptidos de tipo VMV de la envoltura del virus 98.M, 126.M2 y 139 (93% cada uno de 20 ellos), seguido del control Elitest y el péptido 140 de tipo VAEC (ambos 87,5%). Por otro lado, para la detección de los antígenos de tipo VAEC B por los sueros de Aragón, ambos kits control (Chekit y Elitest) así como dos de los péptidos de tipo VAEC (126.M y 140) y un péptido de tipo 25 VMV (139) fueron capaces de detectar un 100% de sueros positivos, mientras que un péptido de tipo VMV (126.M2) detectó un 87,5% de sueros positivos. Estos mismos sueros B confirmaron que la reactividad principal del péptido 75NC era de tipo VAEC. En lo referente a los sueros problema, 30 pertenecientes a la C.F. de Navarra, parecían existir tres grupos de sueros. Los sueros de Navarra 1 reaccionaron en mayor proporción que los de Navarra 3 con 4 de los péptidos VMV (98.M, 157, 75 y 48), mientras que los de Navarra 3

reaccionaron en mayor proporción que los de Navarra 1 con 1 de los péptidos VAEC (140) y 1 de los péptidos VMV (139).

Tabla 6

Zona geográfica de donde provienen los sueros (nro)	Tipo de péptido												LVPR general	Control (MV)
	VAEC				VM				VMM				Eltest (p25) + (IM)	Chekit (virus completo)
	125 M1 (TM)	140 (TM)	76 (NC)	98 M (SU)	126 M2 (TM)	139 (TM)	157 (TM)	75 (NC)	77 M (NC)	81 (NC)	48 (CA)	91 (SU)		
Vista Castilla- León(MV) (n=16)	75	87,5	37,5	93,8	93,8	93,8	43,8	12,5	56	50	50	31	87,5	100
Navarra 1 (n=24)	74	66,7	24	68,5	85	59	37	31,5	66,7	57,4	57,4	44,4	100	98,1
Navarra 2 (n=27)	22,2	25,9	22,2	18,5	14,8	11,1	7,4	14,8	51,9	37	40,7	11,1	0	100
Navarra 3 (n=7)	71,4	85,7	28,6	57,1	85,7	71,4	14,3	0	71,4	57,1	14,3	42,9	100	85,7
Navarra total Chekit+ y/o Eltest+ (n=88)	88	55,7	23,9	52,3	63,6	45,5	26,1	23,9	62,5	51,1	48,9	34,1	69,3	97,7
Navarra negativo a Chekit y/o Eltest (n=16)	63	37,5	18,8	18,8	6,3	6,3	12,5	56,3	31,3	18,8	18,8	0	0	0
Aragón (VAEC) (n=8)	100	100	50	37,5	87,5	100	50	65,5	37,5	25	62,5	25	100	100

Ambos grupos de sueros (Navarra 1 y 3) reaccionaron 100% en Elitest, pero el grupo Navarra 2 no reaccionó en dicho test, siendo este grupo menos reactivo que los otros dos grupos de sueros navarros con cada uno de los 12 péptidos estudiados (con la excepción de los sueros 75 y 48, para los que fue más reactivo que el grupo Navarra 3). Por el contrario, el kit Chekit fue capaz de detectar un 100% de seropositivos en el grupo Navarra 2, disminuyendo su sensibilidad en el grupo Navarra 1 (98,1%) y Navarra 3 (85,7%).

En la totalidad de los sueros de Navarra estudiados positivos a kits comerciales, el test Chekit fue más sensible que Elitest (un 97,7% frente a un 69,3%), siendo el péptido 126.M1 el más reactivo de los péptidos (88% frente a <64% en los restantes péptidos). Sin embargo, algunos de los sueros que dieron negativo en ambos tests comerciales, fueron reactivos con alguno de los péptidos de la invención, siendo el péptido 77.M el más reactivo, con un 56,3% de sueros positivos entre los 16 sueros de este grupo. En conjunto, estos resultados indican que existen kits comerciales y péptidos más adecuados para unos tipos de sueros que para otros de distinto origen/tipo y muestran, de forma preliminar con una batería de 110-128 sueros, cuáles pueden ser los más indicados para los sueros de cada origen/tipo.

Ejemplo 7: Reactividad de cada péptido, tomando como referencia la obtenida en tests comerciales Elitest y Chekit: estudio comparativo según la distribución de sueros respecto de ambos tests.

Como antígenos para este estudio, los 12 péptidos con reactividad media a muy alta se agruparon también según su diseño original en tipos VAEC, VMV y LVPR en general y se

emplearon asimismo como control los antígenos comerciales correspondientes a Elitest y Chekit. Por otro lado, los sueros a los que se enfrentaron los mencionados antígenos se clasificaron en cuatro grupos, según su reactividad en 5 Elitest y Chekit: Elitest+ Chekit+, Elitest+ Chekit-, Elitest- Chekit+ y Elitest- Chekit-. Según se muestra en la Tabla 7, ninguno de los péptidos fue capaz de detectar por sí solo la totalidad de animales seropositivos a ambos tests comerciales (grupo Elitest+ Chekit+), si bien el 10 péptido VMV 126.M2 fue capaz de detectar 90,1% de dichos sueros. Los péptidos 140 y 77.M fueron capaces de detectar respectivamente el 75% y la totalidad de los sueros del grupo Elitest+ Chekit- y 77.M detectó el mayor número de seropositivos en los grupos Elitest- Chekit+ y Elitest- 15 Chekit-, comparado con los demás péptidos. Sin embargo dentro del grupo Elitest+ Chekit+, otros péptidos le superaron en reactividad (no sólo 126.M2, sino también 126.M1, 140, 98.M y 139, todos ellos con más del 70%). El péptido 77.M parecía complementar del todo al test Chekit, 20 para cubrir las reacciones positivas a Elitest en el grupo Elitest+ Chekit-, pero no se encontró ningún péptido que individualmente pudiera complementar al 100% al Elitest para cubrir las reacciones positivas a Chekit en el grupo Elitest- Chekit+, sólo la cubrían muy parcialmente (77.M y 25 48, fundamentalmente).

Tabla 7. Porcentaje de animales seropositivos en los ELISAs de péptidos moderadamente e altamente reactivos en los cuatro grupos establecidos respecto de su seropositividad en Elitest y/o Chekit.

Clasificación de los sueros según reactividad en tests control	VAEC						VMV						Tipo de péptido						LVPR en general
	126 M1 (TM)	140 (TM)	76 (NC)	98 M (SU)	126 M2 (TM)	139 (TM)	157 (TM)	75 (TM)	77 M (NC)	81 (NC)	48 (CA)	91 (SU)							
Eltitest +, Chekit + (n = 81)	77.8	75.3	25.9	71.6	90.1	71.6	37	29.6	60.5	53	48.1	42							
Eltitest +, Chekit - (n = 4)	50	75	25	50	25	50	50	0	100	25	25	0							
Eltitest -, Chekit + (n = 27)	22.2	25.9	22.2	18.5	14.8	11.1	7.4	14.8	51.9	37	40.7	11.1							
Eltitest -, Chekit - (n = 16)	12.5	37.5	18.8	18.8	6.3	6.3	6.3	12.5	56.6	31.3	18.8	18.8							

Ejemplo 8: Verificación de la especificidad de los péptidos seleccionados, tomando como referencia sueros conocidos empleados como control en laboratorios extranjeros.

Con el fin de verificar las especificidades correspondientes a los péptidos estudiados con los sueros españoles, y los sueros problema de otros países (32, procedentes del Reino Unido), se llevó a cabo un estudio adicional empleando los 12 péptidos seleccionados y el siguiente panel de sueros control: a) de Islandia, país del que se erradicó la enfermedad y la infección por LVPR en los años 60, un suero negativo y dos sueros positivos frente a antígenos Visna; b) de Italia, cinco sueros positivos frente a antígenos B1 (3) y B2 (2); y c) de Méjico, un suero positivo frente a antígenos B1.

Asimismo, con el fin de confirmar las observaciones realizadas en los apartados anteriores respecto de sueros españoles, se testaron cinco sueros adicionales procedentes del núcleo Visna de Castilla y León, así como un suero procedente de la infección experimental con estirpes de tipo Visna. Los resultados obtenidos indican que:

a) Los dos sueros islandeses presentaban una reactividad frente a antígenos visna similar a la previamente descrita al compararlos entre sí empleando los 12 péptidos objeto de estudio. Sin embargo, los sueros de animales del brote visna de Castilla y León, presentaban distinta reactividad con 6 de los péptidos. Así los péptidos 98.M, 139 y 140 reaccionaban (100%, 80% y 80%, respectivamente) con los sueros del brote visna de Castilla y León pero no con los dos sueros visna islandeses. Por el contrario, los péptidos 76, 91 y 157 reaccionaban sólo con algunos de los sueros del brote visna de Castilla y León (60%, 40% y 60%, respectivamente) y con los dos sueros

control de animales infectados con la cepa islandesa causante de visna . Posiblemente, los 6 péptidos presentaban un interés diagnóstico para discriminar entre infecciones visna de ambas procedencias. Además, un péptido 5 (126.M2) fue capaz de reaccionar con todos los sueros visna, con independencia de su procedencia.

b) Sin embargo, el péptido 75 no reaccionó con el suero control negativo islandés, por lo que se confirma que 10 podría estar detectando en el rebaño del Reino Unido una seropositividad y su posible interés diagnóstico en dicho país.

Ejemplo 9: Reactividad acumulativa de distintos conjuntos 15 de péptidos, tomando como referencia la obtenida en tests comerciales Elitest y Chekit; estudio comparativo según el origen de los sueros estudiados.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se optó por determinar qué 20 combinaciones de péptidos podrían detectar un mayor número de seropositivos entre los animales infectados con virus de tipo VMV, VAEC o LVPR en general. Como se indica en un ejemplo ilustrativo representado en la **Fig. 2**, tres conjuntos de péptidos fueron cada uno de ellos capaces de 25 detectar un 100% de los animales infectados por VMV visna (de tipo A) procedentes de Castilla y León (98.M con 126.M2; 98.M con 139; o 139 con 126.M2), mientras que el péptido 140 fue capaz de detectar un 100% de los animales infectados por VAEC (de tipo B, bien sea B1 o B2), como 30 también lo hacía con los 5 sueros de especificidad B1/B2 procedentes de Italia (datos no mostrados). Por otro lado, entre los 104 sueros de Navarra estudiados, 93 (es decir, 5 más que los detectados por los dos kits comerciales

conjuntamente) lograban detectarse mediante la combinación de los siguientes péptidos: 76, 77.M, 126.M2 y 140.

En el conjunto de los núcleos estudiados (Castilla y León, Aragón y Navarra) esta misma combinación de péptidos junto al 98.M (aunque este último detectaba muy pocos sueros positivos adicionales, concretamente 3) detectaron una gran mayoría (94 de 112) de positivos a uno o ambos kits comerciales y sirvieron para la detección de LVPR en general, lo que se verificó asimismo en el apartado 1.f que figura más adelante.

Ejemplo 10: Reactividad acumulativa de distintos conjuntos de péptidos, tomando como referencia la obtenida en tests comerciales Elitest y Chekit; estudio comparativo según la distribución de sueros respecto de ambos tests.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se optó por determinar qué combinaciones de péptidos podrían detectar un mayor número de seropositivos entre los animales infectados en los grupos Elitest+ Chekit+, Elitest+ Chekit-, Elitest- Chekit+ y Elitest- Chekit-. Como puede observarse en la **Fig. 3**, el grupo de péptidos 98, 126.M2 y 140 reaccionaron con 80 de los 81 sueros Elitest+ Chekit+.

Por otro lado, el péptido 77.M, como hemos indicado anteriormente, detectaba la totalidad de los sueros Elitest+ Chekit-. Asimismo, el grupo de péptidos 76, 77.M, y 140 detectó 21 de los 27 sueros Elitest- Chekit+.

Finalmente, el grupo de péptidos 76, 77.M, 98.M y 140, detectaron positividad en 14 de los 16 sueros que eran Elitest- Chekit-.

En conjunto, estos resultados indican que existen combinaciones de péptidos de gran interés diagnóstico, y que los péptidos 76, 77.M, 98.M, 126.M2 y 140 pueden ser

de utilidad para complementar a los tests Chekit y Elitest (según se ha especificado en cada caso) en la detección de seropositividad entre animales españoles.

De los análisis comparativos de esta primera etapa, 5 reflejada en los ejemplos 1-10 se puede concluir que los animales seropositivos de cada núcleo poblacional de pequeños rumiantes españoles pueden detectarse mediante los kits comerciales Elitest y especialmente Chekit, y también mediante ELISAs de péptidos, pero puede aumentarse la 10 sensibilidad del diagnóstico en cada uno de estos núcleos, particularizando el empleo de kits y péptidos específicos para cada uno de ellos, según se indica a continuación:

15 **En el brote visna de la C.A. de Castilla y León** (de tipo VMV visna, A) empleando: el kit Chekit, así como los péptidos individuales 98.M, 126.M2 o 139, especialmente al emplear una combinación de dos de ellos.

20 **En los animales de tipo VAEC (B) del brote artrítico de la C.A. de Aragón (B2)** empleando ambos kits comerciales así como los péptidos 126.M1, 140 y 139.

25 **En el conjunto de los animales infectados por LVPR de la C.F. de Navarra** empleando: ambos kits Chekit y Elitest conjuntamente, si bien el test Chekit era más sensible que Elitest en este núcleo de animales; o bien el conjunto de péptidos 76, 77.M, 126.M2 y 140 (aunque 126.M1 individualmente es el más reactivo). La sensibilidad de 30 esta combinación aumenta levemente al incluir en ella el péptido 98.M.

Igualmente, en el **conjunto de los animales infectados**

por LVPR, la combinación 76, 77.M, 126.M2 y 140, que permite detectar una gran mayoría de los sueros positivos, aunque puede aumentarse levemente el nivel de detección al incluirse en la combinación el péptido 98.M.

5 Los kits comerciales de diagnóstico serológico Elitest y, especialmente, Chekit permiten detectar seropositividad a LVPR en los animales infectados objeto de este estudio, procedentes del brote visna de Castilla y León, de tipo A (100%), los del brote artrítico de Aragón, de tipo B (100%)
10 o los de animales infectados por LVPR de Navarra (sueros problema, 97,7%). Sin embargo existen péptidos que pueden complementar a estos kits comerciales, lográndose una mayor sensibilidad. Concretamente se emplearían:

15 - 98M, 126M2 y 140, conjuntamente para diagnóstico general de LVPR

- 77.M, como complemento al kit Chekit (grupo Elitest+ Chekit-)

- 76, 77.M, y 140 como complemento al kit Elitest,
20 siendo 77.M el más reactivo (en el grupo Elitest- Chekit+),

- 76, 77.M, 98.M y 140, como complemento a ambos kits comerciales, siendo 77.M asimismo el más reactivo (grupo Elitest- Chekit-),

- comparativamente, el péptido 126M1 detecta más infecciones VAEC que el péptido 126M2, mientras que este último detecta más infecciones VMV que el 126M1

- ambos kits comerciales conjuntamente frente a su uso individual.

30 2. El péptido 75 diseñado en este estudio puede detectar positividad en rebaños del Reino Unido en los que los tests comerciales (Elitest y Chekit) no llegan a detectar un 10% de seropositivos, de ahí su posible interés

diagnóstico.

Ejemplo 11: Combinación de péptidos de la invención con péptidos conocidos

5

2.a. Péptidos

Se emplearon con fines comparativos los ELISAs de 5 de los péptidos empleados en la primera etapa, definida en los ejemplos anteriores:

10 El péptido 91 (91/ENVgp135 (SEQ ID No: 3)) de la proteína SU (gp135), presentaba una reactividad moderada (en porcentaje de muestras positivas) y detectaba LVPR en general, es decir, tanto estirpes de VMV como de VAEC (Tabla 2).

15 El péptido 98M (98.M/ENVgp135 (SEQ ID No: 8)), que presenta una secuencia aminoacídica característica de la estirpe viral del brote de encefalitis de Castilla y León. Este péptido presentaba una reactividad alta en algunas poblaciones. (Véase **Fig. 2a**)

20 También incluimos en nuestro estudio otros dos péptidos de la proteína TM que presentaban una alta reactividad según se indica en la Tabla 2 y, aun detectando LVPR en general, podrían ayudar a distinguir, según Glaria et al. (2009), las infecciones de tipo VAEC de las de tipo
25 VMV:

El péptido 126M1 (126.M1/ENVgp135 (SEQ ID No: 9)) que reaccionaría más especialmente con sueros frente a antígenos de tipo VAEC (Véase **Fig. 2b**)

30 El péptido 126M2 (126.M2/ENVgp135 (SEQ ID No: 10)) que reaccionaría más especialmente con sueros frente antígenos de tipo VMV (Véanse **Figs. 2c** y **3a**) y visna (animales con sintomatología nerviosa).

Finalmente, el péptido 139 (139/ENVgp46 (SEQ ID No: 11)) también ubicado en la proteína TM de la envoltura viral, presentaba una alta reactividad y detectaba LVPR en general (véase Figs. 2a y 2b).

5 Decidimos proseguir con estos 5 péptidos para testar un mayor número de sueros (análisis a gran escala, n = 535), objetivo que se pretendía para la presente (segunda) etapa. Considerando que: a) el péptido 98.M reaccionaba con los sueros del brote Visna de la C.A. de Castilla y León; 10 los péptidos 126.M1 y 126 M2 detectaban infecciones por LVPR, sobre todo infecciones de tipo VAEC y de tipo VMV, respectivamente y el péptido 139 detectaba en general infecciones por LVPR, y que además estos cuatro péptidos daban lugar a reacciones que discriminaban bien entre 15 positivos y negativos. Además se incorporó a esta fase el péptido 91 que, si bien era de reactividad moderada en el análisis a pequeña escala, detectaba alguna reacción extra respecto de los tests comerciales, por lo que decidimos estudiar su comportamiento en los análisis a gran escala. 20 En suma, se estudiaron 5 nuevos ELISAs sobre una muestra de 535 sueros y se determinó su eficacia de diagnóstico respecto de los tests comerciales Elitest y Chekit (aunque se han empleado también western blot, WB; y PCR para resolver discrepancias cuando se realizaron las 25 comparaciones).

2.b. Animales empleados

Se emplearon un total de 535 Ovinos de los siguientes rebaños y áreas geográficas:

30

- **TMA:** Este rebaño (**157** sueros obtenidos) se encuentra en la **C.A. de Castilla y León (León)**, donde la forma

clínica en la infección por VMV afecta al sistema nervioso central (forma nerviosa).

• **ART**: Este rebaño (**118** sueros obtenidos) se encuentra en **Aragón (Zaragoza)**, donde la forma clínica en la infección por VMV afecta a las articulaciones (forma artrítica).

• **CHA**: Este rebaño (**60** sueros obtenidos) se encuentra en **Aragón (Zaragoza)**, ha sido saneado de Maedi Visna empleando Elitest.

10 • **RMU**: Este rebaño (**50** sueros obtenidos) se encuentra en el **País Vasco (Vizcaya)**, ha sido saneado de Maedi Visna empleando Elitest.

15 • **MLA**: Este rebaño (**50** sueros obtenidos) se encuentra en el **País Vasco (Guipúzcoa)**, se estima de muy baja prevalencia al Maedi Visna según Elitest, con supuesta resistencia natural a LVPR puesto que dicho rebaño jamás ha sido objeto de ningún plan de control.

20 • **OSK**: Este conjunto de animales ubicados en **Navarra** (**58** sueros obtenidos de animales con distintos orígenes) ha sido suministrado por el Centro de Inseminación de Navarra.

• **CLI**: Se trata de un conjunto de animales, no incluidos en los grupos anteriores (**42** sueros) con sintomatología **clínica**, de **León** (n= 31; brote nervioso) y **Zaragoza** (n= 11; brote artrítico y/o pulmonar)

25 • **REP**: grupo de sueros representativos. Con el fin de ilustrar los distintos patrones de reacción observados en los ELISAs de péptidos generados, se ha realizado este estudio, que incluye el suero de un animal representativo de cada una las distintas formas de Maedi Visna (pulmonar, articular, nerviosa), así como sueros frente a antígenos de los tipos VAEC B1 y B2.

Ejemplo 12: Determinación del valor umbral en cada uno de los nuevos ELISAs

Para realizar los tests enfocados hacia la determinación del valor umbral, dispusimos de 135 muestras de suero de ovinos y caprinos (cuyo estatus infectado/no infectado había sido determinado en laboratorios de otros países que trabajan en diagnóstico de LVPR). De ellos, 40 procedían de Italia, 42 de Islandia y 53 de Inglaterra. Todos estos sueros eran supuestamente negativos a los tests de diagnóstico comerciales y, algunos, también a PCR. Dichos sueros supuestamente negativos se emplearon para determinar el umbral, o valor cut-off, de positividad para el ELISA correspondiente a cada uno de los péptidos estudiados (el umbral es el valor a partir del cual un suero debe considerarse positivo en el ELISA correspondiente). Este valor se obtuvo sumando a la media de las absorbancias obtenidas de estos sueros negativos, tres veces la desviación estándar obtenida con ellos.

A continuación se indica el valor umbral obtenido para cada uno de los 5 nuevos ELISAs (cuyo nombre coincide con el del péptido que se emplea para el tapizado).

ELISA-91: 0,4
ELISA-98M: 0,32
25 ELISA-126M1: 0,29
ELISA-126M2: 0,25
ELISA-139: 0,22

Es importante reseñar que a pesar de que teóricamente se partió de animales no infectados en este panel de seronegativos, aparecieron animales seropositivos a algunos de los péptidos los cuales fueron eliminados para el cálculo del valor umbral. Concretamente, fueron positivos

en dicho panel:

4,2% al péptido 91, 2,8% al péptido 126M1 y/o 126M2 y 0,7% al péptido 139.

5 Estas reacciones positivas aparecieron en al menos dos tests ELISA (el del péptido en cuestión y uno de los ELISAs comerciales; o a ningún péptido pero sí a uno de los dos ELISAs comerciales), por lo que es poco probable que se trate de falsos positivos.

10 Una vez conocido el valor umbral, y el comportamiento de los 5 ELISAs con la batería de sueros supuestamente seronegativos, se procedió a analizar los sueros problema (n = 535) para cada uno de los 5 nuevos ELISAs y se compararon los resultados correspondientes con los obtenidos con ELISAs comerciales.
15

Ejemplo 13: Ensayos y resultados obtenidos con los nuevos ELISAs

Considerando que los brotes nervioso de la C.A. de
20 Castilla y León (en adelante, León) y artrítico de la C.A. de Aragón (en adelante, Aragón) representan una seria amenaza para los animales que se crían en Navarra, procedimos en primer lugar a un análisis de los sueros obtenidos en ambas CCAA, con el fin de averiguar la reactividad de los nuevos ELISAs de péptidos y los ELISAs comerciales y determinar cuáles serían las condiciones óptimas para el análisis de LVPR en ambas zonas. Los resultados obtenidos con los sueros analizados, se describen a continuación.

30

Comparación de los tests comerciales entre sí

Animales de Navarra.- Al estudiar los tests comerciales Elitest y Chekit en los animales de Navarra

empleados en esta etapa, de los 70 animales analizados 52 fueron seropositivos a Chekit. Entre los 52 positivos, Elitest detectó menos positivos (59,6%) que Chekit, pero detectó un 11,1% positivos entre los Chekit-negativos 5 (Tabla 8a).

De este estudio se concluye que ninguno de los tests comerciales detectaba todos los positivos en esta población de Navarra, pero Chekit detectaba más positivos que Elitest.

10 **Brote nervioso de León.-** Al estudiar los tests comerciales en el rebaño de León, de los 157 animales analizados, 96 fueron seropositivos y 61 fueron seronegativos a Elitest. Entre los 96 positivos, Chekit detectó menos positivos (88,4%), pero detectó un 23% de 15 positivos entre los Elitest-negativos (Tabla 8a).

De este estudio se concluye que ninguno de los tests detectaba todos los positivos en dicho brote nervioso, pero detectaban un porcentaje de positivos similar, con algunas discrepancias entre ambos tests.

20 **Brote artrítico de Aragón.-** Al estudiar los tests comerciales en los rebaños de Aragón, de los 178 animales positivos a Chekit en el rebaño artrítico (ART), sólo fueron Elitest-positivos un 87%, así Chekit en este rebaño detectó más positivos que Elitest (Tabla 8a).

25 En el rebaño saneado de Aragón (CHA), ninguno de los tests comerciales detectó positividad.

De este estudio se concluye que ninguno de los tests detectaba todos los positivos en Aragón, pero Chekit detectaba más positivos que Elitest en el brote artrítico.

30 **Animales del País Vasco.-** Las dos poblaciones del País Vasco (MLA, supuestamente resistente a LVPR; y RMU, saneado de LVPR) fueron negativas a Elitest, y también a Chekit, a excepción de un 14% de los animales del rebaño MLA, que

presentó reactividad a Chekit (Tabla 8b), por lo que, además del test que se viene realizando en MLA (Elitest), se estima de interés el empleo de Chekit en dicho rebaño.

5 Comparación de los nuevos ELISAs de péptidos entre sí y con los ELISAs comerciales

Animales de Navarra.- Al estudiar los resultados obtenidos con los nuevos ELISAs de péptidos (Tabla 8a), se observó que, en la población de Navarra analizada, ninguno 10 de los péptidos llegó a detectar todos los animales positivos a Chekit. Sin embargo, el conjunto de los 5 ELISAs de péptidos detectó el 69,2% de positivos a Chekit y un 27,8% de positivos entre los negativos a Chekit. El péptido 126M2 (que detecta infecciones por LVPR y más 15 especialmente del genotipo A; véase más adelante) fue el péptido que detectó más positivos entre los negativos a Chekit (el 23,5%); y el 126M1 (que detecta infecciones por LVPR y más especialmente del genotipo B; véase más adelante) fue el que detectó más positivos entre los 20 positivos a Chekit).

Brote nervioso de León.- Al estudiar los resultados obtenidos con los nuevos ELISAs de péptidos (Tabla 8a), se observó que en el brote nervioso ninguno de los péptidos llegó a detectar todos los animales positivos a Elitest. 25 Sin embargo, el conjunto de los 5 ELISAs de péptidos detectó el 98% de positivos a Elitest y el péptido 98M fue el péptido que detectó más positivos (el 91,6%).

Entre los animales negativos a Elitest ($n = 60$) de este brote nervioso, el conjunto de los 5 ELISAs de 30 péptidos detectó un 44,3 de positivos, y el péptido 98M fue el que más positivos detectó (34,4%) entre estos sueros Elitest-negativos.

De todo ello se concluye que ambos ELISAs, Elitest y

el del péptido 98M podrían resultar de interés y complementarios para la detección de infecciones en el brote nervioso de la C.A. de Castilla y León.

Brote artrítico de Aragón.- Al estudiar los resultados obtenidos con los nuevos ELISAs de péptidos (Tabla 8a), se observó que en el brote artrítico ninguno de los péptidos llegó a detectar todos los animales positivos Chekit (100%) o a Elitest (87,2%). Sin embargo, el conjunto de los 5 ELISAs de péptidos detectó el 78,6% de positivos a Chekit y 10 126M1 (que detecta infecciones por LVPR y más especialmente del genotipo B) fue el péptido que detectó más positivos (65,8%).

Entre los animales negativos a Elitest y Chekit en el rebaño saneado (CHA; n = 60) de Aragón, el conjunto de los 15 5 ELISAs de péptidos detectó un 36,8 de positivos, y cada uno de los péptidos 126M1 y 126M2 detectó el mayor porcentaje de positivos (26,6%) entre estos sueros Elitest y Chekit-negativos.

De todo ello se concluye que: a) Chekit seguido de 20 Elitest, en cuanto a porcentaje de positivos detectados, pueden resultar de interés para la detección de seropositivos en el brote artrítico de Aragón; y b) los péptidos 126M1 (que detecta más especialmente infecciones del genotipo B o de tipo VAEC) o 126M2 (que detecta más 25 especialmente infecciones del genotipo A o de tipo VMV) permiten detectar infecciones en rebaños supuestamente saneados (seronegativos a los tests comerciales Chekit y Elitest).

Animales del País Vasco.- Las dos poblaciones del País 30 Vasco (MLA, supuestamente resistente a LVPR; y RMU, saneado de LVPR) (Tabla 8b) mostraron reactividad a alguno de los péptidos, siendo el 98M el que más reactividad presentó en la población supuestamente resistente (38%).

Significativamente, la población saneada de LVPR mostró también reactividad a alguno de los péptidos (126M2, 126M1, 98M y 91, en ese orden). Aunque no se comprobó el estado (infectado/no infectado) de todos los animales por PCR, se realizó un estudio en 17 animales que habían resultado negativos a Chekit pero positivos a algunos péptidos en el rebaño supuestamente resistente (MLA), observándose que al menos 5 (de los 17 animales) presentaban infección (Tabla 8b). Ello indica que una buena parte de las reacciones detectadas por los ELISAs de péptidos desarrollados en este estudio es capaz de detectar infecciones que, por otro lado, escapan a la detección por tests comerciales.

Detección de tipos genéticos VAEC y VMV de LVPR

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la Tabla 8, así como los estudios de secuenciación realizados tras las amplificaciones de provirus por PCR, en los que se demostró que las secuencias del brote nervioso de León eran de tipo VMV y las del brote artrítico de Aragón eran de tipo VAEC, intentamos determinar cómo podríamos emplear los nuevos tests de péptidos o los ELISAs comerciales para distinguir las infecciones de tipo VMV de las de tipo VAEC. Los resultados mostrados en esta 2^a etapa (Ejemplos 11-13), indican que:

El péptido **98M** es eficaz (>90%) para detectar el tipo VMV (y dentro de este tipo genético detecta los animales del brote nervioso de León) y no es útil para detectar el tipo VAEC (por ejemplo en el brote artrítico de Aragón).

Los péptidos **139** y **126M2** detectan en general LVPR con una eficacia media, pero con más eficacia el tipo VMV (de tipo A) que el VAEC, (de tipo B) (62,5% frente a 40%; y 53,1% frente a 42,7%, respectivamente).

El péptido **126M1** detecta en general LVPR, pero con más

eficacia el tipo VAEC que el VMV.

El péptido **91, por si solo**, es ineficaz (< 10%) para detectar infecciones de tipos VMV o VAEC.

En rebaños con infecciones de tipo VMV el péptido **98M** 5 detecta infecciones que no son detectadas por Elitest.

En rebaños negativos a Elitest y Chekit, los péptidos **126M1** y **126M2** detectan infecciones por LVPR.

Elitest es similar en eficacia a Chekit para rebaños con infecciones fundamentalmente de tipo VMV (de tipo A).

10 **Chekit** es más idóneo que Elitest para rebaños con infección fundamentalmente de tipo VAEC (de tipo B).

En conjunto, estos resultados indican que el péptido 98M, cuando se compara con los demás péptidos estudiados, es el que más positivos detecta entre los seropositivos y 15 los seronegativos a uno de los tests comerciales (Elitest, en este caso). La asignación mencionada de especificidades a los distintos ELISAs de péptidos desarrollados se comprobó mediante el estudio de muestras séricas: a) de animales representativos prototípico; y b) de animales con 20 afección clínica por LVPR, obteniéndose los patrones de reactividad esperados:

a) En animales representativos de 7 prototipos conocidos (representados entre VMV de tipo A y VAEC de tipo B)*:

25 españoles, con afección

• Pulmonar (ovino y estirpe Núm. 258, de tipo VMV):
Positivo a 139 (de tipo A)

• Articular (ovino y estirpe Núm. 496, de tipo VAEC):
Positivo a 126M1 (de tipo B) y 126M2

30 • Nerviosa (ovino y estirpe Núm. 697, de tipo VMV):
Positivo al péptido 91, el 98M, el 126M2 y el 139 (de tipo A)

* Nota: Es importante tener en cuenta que, en ovinos, las afecciones pulmonares pueden estar causadas por LVPR de tipo VMV o de tipo VAEC, las artríticas más frecuentemente por virus de tipo VAEC y las nerviosas por los de tipo VMV
5 b) En ovinos españoles (n = 42) clínicamente afectados por LVPR:

- Aragón: n=11. Positivos a Chekit y Elitest, de los cuales 5 presentaron afección pulmonar y 2 artrítica (de 10 los 4 restantes no se dispuso de información). Globalmente, el 81% fueron positivos al péptido 126M1. En particular, de los 5 "pulmonares", 4 fueron positivos al péptido 126M1 y al péptido 126M2, 3 al péptido 139, 1 al péptido 98M (por lo que parecía haber infecciones de los tipos A y B); los 2 15 artríticos fueron positivos al 126M1 (VAEC, de tipo B).
- León: n=31. El 90% de los animales que mostraron síntomas nerviosos de la zona de León fueron positivos al péptido 98M (de tipo A).

Tabla 8a. Estudio de la reactividad en cinco ELISAs de péptidos (91, 98M, 126M1, 126M2 y 139) y dos ELISAs comerciales (Elitest y Chekit) empleando sueros de ovinos ($n=405$) pertenecientes a rebaños de los brotes de LVR nervioso (MVV-like, de Castilla y León, $n=157$), atrítico (VAEC-like, de Aragón, $n=178$), y de animales ubicados en Navarra ($n=70$) de distintas procedencias (elegidos por el Centro de Inseminación de Oskotz, Gobierno de Navarra).

Origen	Tipo de brote en el rebaño	Tipo genético más frecuente	Rebaño						Porcentaje de animales positivos a ELISA realizado con					
			Resultado en test comercial	Nº de sueros	Péptido 91	Péptido 98M	Péptido 126M1	Péptido 126M2	Péptido 139	Alguno de estos cinco péptidos	Chekit	Elitest		
Navarra	Animales elegidos por centro de inseminación	Mixto MVV-like y VAEC-like	Positivos a Chekit	52	23	27	42,3	38,5	9,6	69,2	100	59,6		
			Negativos a Chekit	18	0	5,5	11,1	23,5	0	27,8	0	11,1		
Castilla y León	Nervioso	MVV-like	Positivos a Elitest	96	93	91,6	21,8	53,1	62,5	98	88,4	100		
			Negativos a Elitest	61	8	34,4	11,4	16,3	16,4	44,3	23	0		
Aragón	Atrítico	VAEC-like	Positivos a Chekit	118	5,8	6,8	65,8	42,7	40,1	71,8	100	87,2		
			Negativos a Chekit	60	10	0	26,6	26,6	0	36,6	0	0		
	Sin brote (sanado de LVR)													

Tabla 8b. Estudio de la reactividad en cinco ELISAs de péptidos (91, 98M, 126M1, 126M2 y 139) y dos ELISAs comerciales (Elitest y Chekit) empleando sueros de ovinos (n=100) en rebaños sanneados o con una supuesta resistencia a LVPR procedentes del País Vasco.

Rebaño	Origen	Tipo de brote en el rebaño*	Resultado en test comercial	Nº de sueros	Porcentaje de animales positivos a ELISA realizado con				Porcentaje de animales positivos a ELISA comercial		
					Péptido 91	Péptido 98M	Péptido 126M1	Péptido 126M2	Alguno de estos cinco péptidos	Chekit	Elitest
Guipuzcoa (País Vasco)	MLA Calificado "Resistente" de forma natural	Negativos a Elitest	50	6	38	16	10	8	44	14	0
RMU Sin brote (saneado de LVPR)	Negativos a Elitest	50	10	12	20	22	0	34	0	0	0
Vizcaya (País Vasco)	Negativos a Elitest										

* MLA: De los positivos a alguno de los péptidos (44% 22 animales), el 86% fueron positivos al péptido 98M. De los 22 animales, 17 (77%) fueron negativos a Chekit, pero 5 de ellos fueron positivos por PCR; de los restantes 5 (23%) positivos a Chekit, 3 fueron también positivos por PCR.
De los 7 animales positivos a Chekit (14%), 4 también lo fueron al péptido 98M.

RMU: De los positivos a alguno de los péptidos, el 64,7% fueron positivos a los péptidos 126M1 y/o 126M2.

Ejemplo 14: Identificación y utilización del péptido 98 M

El estudio descrito en los apartados anteriores ha permitido realizar un análisis comparativo del ELISA-98M entre los ELISAs de los 96 péptidos sintetizados. Este 5 análisis se ha realizado en dos etapas, en la primera de ellas se analiza dicho ELISA comparativamente frente a una amplia batería de ELISAs (de los otros 95 péptidos y los 2 ELISAs comerciales), todos ellos empleando un panel de sueros de tamaño limitado (hasta 128); y en la segunda 10 etapa se analiza el ELISA-96M comparativamente frente a una reducida representación de ELISAs (otros 4 ELISAs de péptidos y dos ELISAs comerciales), todos ellos empleando una amplia batería de sueros (> 500). Del análisis se concluye la aplicabilidad del ELISA-98M en especial para la 15 detección de infecciones en animales del brote visna de la C.A. de Castilla y León.

En vista de ello, decidimos proseguir en dicha población con el análisis de la eficacia del ELISA-98M comparándolo con los ELISAs comerciales individualmente 20 (Tablas 9a y 9b), realizando las estimaciones de concordancia entre tests (estadístico kappa, descrito en Landis y Koch, 1977), sensibilidad y especificidad, a partir de los resultados obtenidos. Como se indica en la Tabla 9, se llevó a cabo dicho estudio de concordancia 25 (estadístico kappa \pm error estándar, $\kappa \pm$ ES, e intervalos de confianza, IC, del 95%) así como determinaciones de sensibilidad y especificidad del ELISA-98M al compararlo con: Elitest, Chekit, ambos conjuntamente concordantes y "Gold standard", que se obtuvo analizando además por 30 western blotting los sueros de los 10 animales de la Tabla 9c que resultaron discordantes (ELISA-98M "+" y Elitest "+" Chekit "-"). Se comprobó que 3 de estos 10 animales eran positivos en western blotting, por lo que se consideraron

infectados, descendiendo así este grupo de discordantes menor (a n=7), según se refleja en la Tabla 9d. Por ello, según los datos que se reflejan en la Tabla 2, el grado de concordancia fue de sustancial a muy bueno entre el ELISA-5 98M y el Gold estándar (referente al estatus infectado/no infectado) fue de $K = 0,78 \pm 0,06$, con un intervalo de confianza del 95% entre 0,44 y 0,71). Así la sensibilidad y la especificidad del ELISA-98M respecto del Gold estándar fue de 93,1% y 84,3%, respectivamente. Es importante 10 destacar que este gold estándar está definido tan solo con técnicas serológicas. Los resultados de concordancia empleando además PCR, indican que el valor de sensibilidad y especificidad podría verse incrementado en un estudio a mayor escala.

15 El péptido 98.M presenta la secuencia 646-660 (SEQ ID No: 8) de la proteína de superficie de la envoltura (ENV gp135 del virus LVPR) (**Fig. 1**).

20 Procedimiento ELISA basado en el péptido 98M.- Se trata de un ELISA indirecto con pocillos tapizados con el péptido 98M para la detección de anticuerpos frente a LVPR que, esencialmente consiste en los siguientes pasos:

Sensibilizar las placas de poliestireno (ProBind microplates) de 96 pocillos, para lo que se depositarán 50 μ l de péptido por cada pocillo (300 ng/pocillo) 25 disuelto en tapón carbonato/bicarbonato 0.1M pH 9.6. Se incubarán toda la noche a 37° C (16 h) hasta la evaporación del pocillo.

- Al siguiente día se lavarán las placas 3 veces con 300 μ l de solución de lavado (PBS-Tween 0.1%).
- 30 • Posteriormente se bloquearán los sitios de adsorción residuales de las placas con 150 μ l de caseína al 2.5%-PBS-Tween 1 hora a 37° C.

- Lavar 3 veces con solución de lavado (PBS-Tween 0.1%).
 - Añadir a cada pocillo 100 μ l de suero diluido 1/20 en solución de dilución (PBS- Tween-caseína 1.25%) e 5 incubar 1 h a 37° C.
 - Después de la incubación, lavar la placa 3 veces con 300 μ l de buffer de lavado por pocillo, cada vez.
 - Adicionar 100 μ l de proteína G (0,2 μ g/ml) e incubar 1 h a 37° C.
- 10 • Lavar la microplaca 2 veces con PBS-Tween y 2 veces más con PBS solo.
- Agregar 100 μ l del cromógeno ABTS® a cada pocillo e incubar durante 30 minutos a 22 - 24° C.
- Realizar la lectura en un espectrofotómetro a una 15 longitud de onda de 405 nm.

PBS pH 7.4 Sigma

Buffer de carbonatos 0.1M pH 9.6: Na₂CO₃ 3.18 g, NaHCO₃ 5.86 g, H₂O csp 1000 ml

20 Mantener a 4°C.

Interpretación de los resultados

A partir de una batería de sueros negativos se determinó el valor umbral, o valor cut-off, de positividad 25 para el ELISA correspondiente a cada uno de los péptidos estudiados (el umbral es el valor a partir del cual un suero debe considerarse positivo en el ELISA correspondiente). Este valor se obtuvo sumando a la media de las absorbancias obtenidas de estos sueros negativos, 30 tres veces la desviación estándar obtenida con ellos. Para el cálculo del valor ELISA, a valor de D.O. obtenida por la muestra, se le resta la D.O. de su (pocillo suero sin

antígeno). Valores superiores al valor umbral (para ELISA-98M el valor umbral es 0,32) se consideran positivos y los inferiores al mismo, negativos.

Características de la secuencia aminoacídica del 5 péptido 98M.

Pertenece a una región hidrofílica y antigénica de la proteína SU de ENV (**Fig. 1**). Su secuencia (SEQ ID No: 8), corresponde a un péptido que se halla en la zona variable (V5) de esta proteína (Germain et al., 2008). En esta 10 secuencia indicamos subrayados los aminoácidos diferentes (6 de los 15 aminoácidos, o sea 40%), respecto de otras estirpes de genotipo A como la EV1. También se distingue la secuencia del péptido 98M de las secuencias visna obtenidas a partir de la estirpe islandesa causante de visna (forma 15 nerviosa) la estirpe Kv1514, con 5 aminoácidos de diferencia respecto de ellas (30% de diferencias respecto de dichas estirpes) (**Fig. 1**). En suma, la secuencia de este péptido no podría haberse diseñado a partir de resultados publicados sin conocer las características genéticas de las 20 secuencias del virus presente en el brote nervioso de Castilla y León.

Tabla 9. Estudios de concordancia (cálculo del coeficiente kappa y su error estándar, $\kappa \pm ES$, y el intervalo de confianza, IC, al 95%) sensibilidad y especificidad comparando los resultados (positivo, "+"; o negativo "-", según se indica) del nuevo ELISA basado en el péptido 98M con los ELISAs Chekit (a), Elitest (b), ambos tests (Eliptest y Chekit) conjuntamente produciendo un mismo resultado (c) y Gold estándar (d), obtenido tras la aplicación de los diferentes tests y western blot.

a)

Brote de León (n=157)		Chekkit	5	Concordancia: $\kappa = 0.57 \pm 0.07$ (Moderada) (IC 95%: 0.44<0.57<0.71) Asumiendo Chekkit como técnica de referencia: Sensibilidad de ELISA de 98M = 89.9% Especificidad de ELISA de 98M = 65.5%
		+ -		
98M		+ 89 20 - 10 38 10		

b)

Brote de León (n=157)		Elitest	15	Concordancia: $\kappa = 0.59 \pm 0.07$ (Moderada) (IC 95%: 0.47<0.59<0.73) Asumiendo Elitest como técnica de referencia: Sensibilidad de ELISA de 98M = 91.7% Especificidad de ELISA de 98M = 65.6%
		+ -		
98M		+ 88 21 - 8 40 20		

c)

Brote de León (n=131)		Ambos Elitest y Chekkit	25	Concordancia: $\kappa = 0.73 \pm 0.06$ (Sustancial) (IC 95%: 0.61<0.73<0.85) Asumiendo Elitest+Chekkit como técnica de referencia: Sensibilidad de ELISA de 98M = 92.9% Especificidad de ELISA de 98M = 78.7%
		+ -		
98M		+ 78 10 - 6 37 30		

d)

Brote de León (n=131)		Gold estándar	35	Concordancia: $\kappa = 0.78 \pm 0.06$ (Sustancial) (IC 95%: 0.66<0.78<0.89) Asumiendo Elitest+Chekkit como técnica de referencia pero los resultados corregidos con western blotting (Gold estándar): Sensibilidad de ELISA de 98M = 93.1% Especificidad de ELISA de 98M = 84.1%
		+ -		
98M		+ 81 7 - 6 37		

REFERENCIAS

- Alvarez, V., Daltabuit-Test, M., Arranz, J., Leginagoikoa, I., Juste, R.A., Amorena, B., de Andres, D., 5 Lujan, L., Badiola, J.J., Berriatua, E., 2006, PCR detection of colostrum-associated Maedi-Visna virus (MVV) infection and relationship with ELISA-antibody status in lambs. *Res Vet Sci* 80, 226-234.
- Benavides, J., Garcia-Pariente, C., Carmen Ferreras, 10 Fuertes, M., Francisco Garcia-Marin, J., Perez, V., 2006a, Diagnosis of clinical cases of the nervous form of Maedi-Visna in 4- and 6-month-old lambs. *Vet J.*
- Benavides, J., Gomez, N., Gelmetti, D., Ferreras, M.C., Garcia-Pariente, C., Fuertes, M., Garcia-Marin, J.F., 15 Perez, V., 2006b, Diagnosis of the nervous form of Maedi-Visna infection with a high frequency in sheep in Castilla y Leon, Spain. *Vet Rec* 158, 230-235.
- Biescas, E., Pérez, M., Marín, B., Baselga, R., Reina, R., de Andrés, D., Amorena, B., Badiola, J.J., Luján, L. 20 2005. Implicación del virus Maedi Visna en casos de artritis de ovino adulto. XVII Reunión de la SEAPV, Jarandilla de la Vera (Cáceres), 14-16 de junio 2005.
- Blacklaws, B.A., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Watt, N.J., de Andres, D., Klein, D., Harkiss, G.D., 2004, 25 Transmission of small ruminant lentiviruses. *Vet Microbiol* 101, 199-208.
- Brinkhof, J., van Maanen, C., 2007, Evaluation of five enzyme-linked immunosorbent assays and an agar gel immunodiffusion test for detection of antibodies to small 30 ruminant lentiviruses. *Clin Vaccine Immunol* 14, 1210-1214.
- de Andres, D., Klein, D., Watt, N.J., Berriatua, E., Torsteinsdottir, S., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., 2005, Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses. *Vet*

Microbiol 107, 49-62.

Fevereiro, M., Barros, S., Fagulha, T., 1999, Development of a monoclonal antibody blocking-ELISA for detection of antibodies against Maedi-Visna virus. J Virol Methods 81, 101-108.

Germain, K., Croise, B., Valas, S., 2008, Field evaluation of a gag/env heteroduplex mobility assay for genetic subtyping of small-ruminant lentiviruses. J Gen Virol 89, 2020-2028.

10 Gjerset, B., Jonassen, C.M., Rimstad, E., 2007, Natural transmission and comparative analysis of small ruminant lentiviruses in the Norwegian sheep and goat populations. Virus Res 125, 153-161.

15 Gjerset, B., Rimstad, E., Teige, J., Soetaert, K., Jonassen, C.M., 2009, Impact of natural sheep-goat transmission on detection and control of small ruminant lentivirus group C infections. Vet Microbiol 135, 231-238.

20 Glaria, I., Reina, R., Crespo, H., de Andrés, X., Ramírez, H., Biescas, E., Pérez, M., Badiola, J.J., Luján, L., Amorena, B., de Andrés, D. 2009. Phylogenetic analysis of SRLV sequences from an arthritic sheep outbreak demonstrates the introduction of CAEV-like viruses among Spanish sheep. Veterinary Microbiology 138, 156-162

25 Gonzalez, B., Reina, R., Garcia, I., Andres, S., Glaria, I., Alzueta, M., Mora, M.I., Jugo, B.M., Arrieta-Aguirre, I., de la Lastra, J.M., Rodriguez, D., Rodriguez, J.R., Esteban, M., Grillo, M.J., Blacklaws, B.A., Harkiss, G.D., Chebloune, Y., Lujan, L., de Andres, D., Amorena, B., 2005, Mucosal immunization of sheep with a Maedi-Visna 30 virus (MVV) env DNA vaccine protects against early MVV productive infection. Vaccine 23, 4342-4352.

Grego, E., Bertolotti, L., Quasso, A., Profiti, M., Lacerenza, D., Muz, D., Rosati, S., 2007, Genetic

characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J Gen Virol* 88, 3423-3427.

Herrmann-Hoesing, L.M., White, S.N., Lewis, G.S.,
5 Mousel, M.R., Knowles, D.P., 2007, Development and validation of an ovine progressive pneumonia virus quantitative PCR. *Clin Vaccine Immunol* 14, 1274-1278.

Herrmann, L.M., Cheevers, W.P., Marshall, K.L., McGuire, T.C., Hutton, M.M., Lewis, G.S., Knowles, D.P.,
10 2003, Detection of serum antibodies to ovine progressive pneumonia virus in sheep by using a caprine arthritis-encephalitis virus competitive-inhibition enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 10, 862-865.

Hopp, T.P., Woods, K.R., 1981, Prediction of protein
15 antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 3824-3828.

Hotzel, I., Kumpula-McWhirter, N., Cheevers, W.P.,
2002, Rapid evolution of two discrete regions of the caprine arthritis-encephalitis virus envelope surface
20 glycoprotein during persistent infection. *Virus Res* 84, 17-25.

Karr, B.M., Chebloune, Y., Leung, K., Narayan, O.,
1996, Genetic characterization of two phenotypically distinct North American ovine lentiviruses and their
25 possible origin from caprine arthritis-encephalitis virus. *Virology* 225, 1-10.

Kolaskar, A.S., Tongaonkar, P.C., 1990, A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett* 276, 172-174.

30 Kyte, J., Doolittle, R., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157, 105-132.

Lacerenza, D., Giammarioli, M., Grego, E., Marini, C.,

Profiti, M., Rutili, D., Rosati, S., 2006, Antibody response in sheep experimentally infected with different small ruminant lentivirus genotypes. *Vet Immunol Immunopathol* 112, 264-271.

5 Landis, J.R., Koch, G.G., 1977, The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* 33, 159-174.

Mordasini, F., Vogt, H.R., Zahno, M.L., Maeschli, A., Nenci, C., Zanoni, R., Peterhans, E., Bertoni, G., 2006, 10 Analysis of the antibody response to an immunodominant epitope of the envelope glycoprotein of a lentivirus and its diagnostic potential. *J Clin Microbiol* 44, 981-991.

Perez, M., Biescas, E., de Andres, X., Leginagoikoa, I., Salazar, E., Berriatua, E., Reina, R., Bolea, R., de 15 Andres, D., Juste, R.A., Cancer, J., Gracia, J., Amorena, B., Badiola, J.J., Lujan, L., 2009, Visna/maedi virus serology in sheep: Survey, risk factors and implementation of a successful control programme in Aragon (Spain). *Vet J.*

Pisoni, G., Quasso, A., Moroni, P., 2005, Phylogenetic 20 analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep. *Virology* 339, 147-152.

Ramirez, H., Roman, B.S., Glaria, I., Reina, R., Hernandez, M.M., de Andres, X., Crespo, H., Hichou, B., 25 Cianca, S., Goni, C., Grandas, A., Garcia-Pastor, L., Vijil, L.E., Quintin, F., Grillo, M.J., de Andres, D., Amorena, B., 2009, Antibody-based diagnosis of small ruminant lentivirus infection in seminal fluid. *Theriogenology* 72, 1085-1096.

30 Reina, R., Berriatua, E., Lujan, L., Juste, R., Sanchez, A., de Andres, D., Amorena, B., 2009a, Prevention strategies against small ruminant lentiviruses: an update. *Vet J* 182, 31-37.

- Reina, R., Bertolotti, L., Dei Giudici, S., Puggioni, G., Ponti, N., Profiti, M., Patta, C., Rosati, S., 2009b, Small ruminant lentivirus genotype E is widespread in Sarda goat. *Vet Microbiol.*
- 5 Reina, R., Grego, E., Bertolotti, L., De Meneghi, D., Rosati, S., 2009c, Genome analysis of small-ruminant lentivirus genotype E: a caprine lentivirus with natural deletions of the dUTPase subunit, vpr-like accessory gene, and 70-base-pair repeat of the U3 region. *J Virol* 83, 1152-1155.
- 10 Reina, R., Grego, E., Profiti, M., Glaria, I., Robino, P., Quasso, A., Amorena, B., Rosati, S., 2009d, Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E. *Vet Microbiol* 138, 251-257.
- 15 Reina, R., Mora, M.I., Glaria, I., Garcia, I., Solano, C., Lujan, L., Badiola, J.J., Contreras, A., Berriatua, E., Juste, R., Mamoun, R.Z., Rolland, M., Amorena, B., de Andres, D., 2006, Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis 20 Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain. *Virus Res* 121, 189-198.
- Saman, E., Van Eynde, G., Lujan, L., Extramiana, B., Harkiss, G., Tolari, F., Gonzalez, L., Amorena, B., Watt, N., Badiola, J., 1999, A new sensitive serological assay 25 for detection of lentivirus infections in small ruminants. *Clin Diagn Lab Immunol* 6, 734-740.
- Sargan, D.R., Bennet, I.D., Cousens, C., Roy, D.J., Blacklaws, B.A., Dalziel, R.G., Watt, N.J., McConnell, I. 1991Nucleotide sequence of EV1, a British isolate of maedi-visna virus. *J Gen Virol.* 72:1893-903.
- 30 Shah, C., Huder, J.B., Boni, J., Schonmann, M., Muhlher, J., Lutz, H., Schupbach, J., 2004, Direct evidence for natural transmission of small-ruminant

lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa. *J Virol* 78, 7518-7522.

Toft, N., Akerstedt, J., Tharaldsen, J., Hopp, P., 2007, Evaluation of three serological tests for diagnosis 5 of Maedi-Visna virus infection using latent class analysis. *Vet Microbiol* 120, 77-86.

Valas, S., Benoit, C., Guionaud, C., Perrin, G., Mamoun, R.Z., 1997, North American and French caprine 10 arthritis-encephalitis viruses emerge from ovine maedi-visna viruses. *Virology* 237, 307-318.

Varea, R., Monleon, E., Pacheco, C., Lujan, L., Bolea, R., Vargas, M.A., Van Eynde, G., Saman, E., Dickson, L., Harkiss, G., Amorena, B., Badiola, J.J., 2001, Early 15 detection of maedi-visna (ovine progressive pneumonia) virus seroconversion in field sheep samples. *J Vet Diagn Invest* 13, 301-307.

Zanoni, R.G., Nauta, I.M., Kuhnert, P., Pauli, U., Pohl, B., Peterhans, E., 1992, Genomic heterogeneity of 20 small ruminant lentiviruses detected by PCR. *Vet Microbiol* 33, 341-351.

Zanoni, R.G., Vogt, H.R., Pohl, B., Bottcher, J., Bommeli, W., Peterhans, E., 1994, An ELISA based on whole virus for the detection of antibodies to small-ruminant lentiviruses. *Zentralbl Veterinarmed [B]* 41, 662-669.

REIVINDICACIONES

1.- Péptido que comprende un fragmento inmunogénico de una estirpe Española de un virus LVPR a elegir entre los 5 subtipos filogenéticos B2 artrítica, A pulmonar o A2 nerviosa y que comprende una secuencia de aminoácidos a elegir entre: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11 o SEQ ID No. 12 y/o combinaciones de los mismos.

10

2.- Péptido, según la reivindicación 1, caracterizado porque es específico de la estirpe de campo Castellano-Leonesa A2 nerviosa del LVPR.

15

3.- Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 compuesto por, al menos, 15 aminoácidos.

4.- Péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 que comprende la secuencia aminoacídica SEQ ID No: 8

20

5.- Uso de alguno de los péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos a elegir entre: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11 o SEQ ID No. 12, o 25 combinaciones de los mismos, para fabricar un test diagnóstico in vitro para la infección por LVPR.

30

6.- Uso de alguno de los péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos a elegir entre: SEQ ID No. 1, SEQ ID No. 2, SEQ ID No. 3, SEQ ID No. 4, SEQ ID No. 5, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 8, SEQ ID No. 11 o SEQ ID No. 12 o

combinaciones de los mismos para fabricar una vacuna contra las infecciones causadas por LVPR

7.- Composición peptídica basada en una combinación de 5 péptidos que comprende al menos un péptido de la reivindicación 1 y al menos otro péptido que comprende una secuencia de aminoácidos a elegir entre: SEQ ID No.6, SEQ ID No. 9 o SEQ ID No 10.

10 8.- Composición peptídica según la reivindicación 7 que comprende al menos dos péptidos que comprenden una secuencia de aminoácidos a elegir entre: SEQ ID No. 3, SEQ ID No 4, SEQ ID No. 7, SEQ ID No. 9.

15 9.- Uso de una composición peptídica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8 para fabricar un kit de diagnóstico in vitro para la infección por LVPR.

10.- Uso de una composición peptídica según cualquiera 20 de las reivindicaciones 7 u 8 para fabricar una vacuna contra la infección por LVPR.

11.- Ácido nucleico que codifica para un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

25 12.- Uso de un ácido nucleico según la reivindicación 11 o de una pareja de cebadores específicos, a elegir del grupo definido por las SEQ ID Nos: 13-33, para fabricar un kit de diagnóstico in vitro para la infección por LVPR.

30 13.- Uso de un ácido nucleico según la reivindicación 11 para fabricar una vacuna contra la infección por LVPR.

14.- Anticuerpo que se une específicamente a un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

5 15.- Uso de un anticuerpo, según la reivindicación 14, para fabricar un kit de diagnóstico in vitro para la infección por LVPR.

10 16.- Uso de un anticuerpo, según la reivindicación 14, para fabricar una vacuna contra la infección por LVPR.

15 17.- Método para la detección in vitro de una infección por alguna estirpe Española del virus LVPR de los subtipos filogenéticos B2 artrítica, A pulmonar o A2 nerviosa, que comprende la unión específica entre un anticuerpo y un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.

20 18.- Método según la reivindicación 17 en que, opcionalmente, se emplea al menos un segundo anticuerpo capaz de unirse específicamente a un péptido comprendido en la composición peptídica según cualquiera de las reivindicaciones 7 u 8.

25 19.- Método según cualquiera de las reivindicaciones 17 y 18 caracterizado porque se emplea un anticuerpo capaz de unirse específicamente a un péptido codificado por un ácido nucleico según la reivindicación 11.

30 20.- Método según cualquiera de las revindicaciones 17 a 19 caracterizado porque se emplea un anticuerpo según la reivindicación 14.

21.- Kit para la detección de infección por LVPR que comprende al menos un péptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, o un ácido nucleico según la reivindicación 11, o una pareja de cebadores, a elegir del 5 grupo definido por las SEQ ID Nos: 13-33, o un anticuerpo según la reivindicación 14.

22.- Kit según la reivindicación 21 que comprende un soporte sólido.

10

23. Kit según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 22 que, comprende una composición peptídica según las reivindicaciones 7 u 8.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Universidad Pública de de Navarra
<110> Consejo Superior de Investigaciones Científicas

<120> PÉPTIDOS PARA DETECTAR ESTIRPES DE LENTIVIRUS

<130> P-04007

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 75 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína GAG p14 del virus Maedi-Visna

<400>

Pro Glu Arg Lys Gly Arg Asn Gln Gly Met Gly Gln Lys Cys Tyr
1 5 10 15

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 76 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína GAG p14 del virus VAEC

<400>

Pro Glu Lys Gly Lys Arg Asn Gly Pro Gln Gln Arg Cys Tyr Asn
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 91 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína ENV gp135 del LVPR

<400>

Cys Ser Leu Pro His Lys Asn Glu Ser Asn Lys Trp Thr Cys Ala
1 5 10 15

ES 2 387 243 B1

<210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 157 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína ENV gp46 del virus Maedi-Visna

<400>

Lys Asn Lys Lys Glu Arg Val Asp Cys Gln Asp Arg Glu Gln Arg
1 5 10 15

<210> 5
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 48 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína GAG p25 del virus Maedi-Visna

<400>

Lys Leu Asn Glu Glu Ala Glu Arg Trp Val Arg Gln Asn Pro Pro
1 5 10 15

<210> 6
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 81 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína GAG p14 del virus Maedi-Visna

<400>

Gly Asn Asn Arg Arg Gly Pro Arg Val Val Pro Ser Ala Pro Pro
1 5 10 15

<210> 7
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 77.M correspondiente a una secuencia parcial de la proteína GAG p14 del virus Maedi-Visna

<400>

Met Gln Lys Asp Cys Arg Gln Lys Gln Gln Gly Asn Asn Arg
1 5 10 15

ES 2 387 243 B1

<210> 8
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 98 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína ENV gp135 del virus Maedi-Visna

<400>

Val	Asp	Met	Pro	Gln	Ser	Tyr	Ile	Glu	Lys	Gln	Lys	Arg	Asn	Lys
1					5				10					15

<210> 9
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 126 M1 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína ENV gp135 del VAEC

<400>

Glu	Leu	Asp	Cys	Trp	His	Tyr	His	Gln	Tyr	Cys	Val	Thr	Ser	Thr
1					5				10					15

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 126 M2 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína ENV gp135 del virus Maedi-Visna

<400>

Glu	Leu	Asp	Cys	Trp	His	Tyr	Gln	His	Tyr	Cys	Val	Thr	Ser	Thr
1					5				10					15

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 139 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína ENV gp46 del virus Maedi-Visna

<400>

His	Ile	Ala	Gln	Arg	Asp	Ala	Ser	Arg	Ile	Pro	Asp	Val	Trp	Thr
1					5				10					15

ES 2 387 243 B1

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial
<220>
<223> Péptido 140 correspondiente a una secuencia parcial de la proteína ENV gp46 del VAEC

<400>

Gln Leu Ala Gln Glu Gln Ala Arg Arg Ile Pro Asp Val Trp Glu
1 5 10 15

<210> 13
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3'env-CAEV2 Fw Virus Maedi-Visna

<400>

atgggaatct ggataaaatgg a 21

<210> 14
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 3'-5'Gag Cen LVPR Rv Virus Maedi-Visna

<400>

gctctrtyc caggcatcat 20

<210> 15
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3'Wie5 Fw Virus Maedi-Visna

<400>

cttgtgtccg aggattttga 20

<210> 16
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 3'-5'Gag Fin LVPR Rv Virus Maedi-Visna

<400>

tcyccttcta taatcccycc tat 23

ES 2 387 243 B1

<210> 17
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3' 496 VRC Fw Virus Maedi-Visna

<400>

aagatgcaag catgcaggga c 21

<210> 18
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3' Pol I Fw LVPR Virus Maedi-Visna

<400>

tggatgatat ytayataggr agtg 24

<210> 19
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 3'-5' Pol II Rv LVPR Virus Maedi-Visna

<400>

aaatcatayc cwgcacatcttc 20

<210> 20
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3' Pol II Fw LVPR Virus Maedi-Visna

<400>

ggacaagccc tatggatatw t 21

<210> 21
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 3'-5' TAT Rv LVPR Virus Maedi-Visna

<400>

ggttacatacg yctrcahcca cad 23

<210> 22

ES 2 387 243 B1

<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3' 5084 Fw Virus Maedi-Visna

<400>

caamgatggc thgcwatgc 19

<210> 23
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 3'-5' SU 1 LVPR Rv Virus Maedi-Visna

<400> 23
tctgtrcadg adacwgctyt tgc 23

<210> 24
<211> 23
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3' SU 2 LVPR Fw Virus Maedi-Visna

<400>
gcaggravma tmagrggaag att 23

<210> 25
<211> 24
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 3'-5' 567 Rv Virus Maedi-Visna

<400>

ccacatwgtt gtccaatthg tdtt 24

<210> 26
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3' SU 3 LVPR Fw Virus Maedi-Visna

<400>

gatgyaaytg ywcamgrtca gg 22

<210> 27

ES 2 387 243 B1

<211> 19
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 3'-5' TM 1 LVPR Rv Virus Maedi-Visna

<400>

gcttcyacyc kagchactc 19

<210> 28
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3' TM2 LVPR Fw Virus Maedi-Visna

<400>

trgchaaagg vrtamgmatc 20

<210> 29
<211> 21
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 3'-5' LTR LVPR Rv Virus Maedi-Visna

<400>

gcggttacat ttgctktgtc a 21

<210> 30
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3' LVPR Fw Virus Maedi-Visna

<400>

tggcctytmt ggcaaatgga 20

<210> 31
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 5'-3' 566 Fw Virus Maedi-Visna

<400>

gtragagctt ayacatatgg 20

ES 2 387 243 B1

<210> 32
<211> 20
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador 3'-5' TM3 LVPR Rv Virus Maedi-Visna

<400>

gcagckayta twgccatgat 20

<210> 33
<211> 22
<212> ADN
<213> Artificial
<220>
<223> Cebador TM4 LVPR Fw 5'-3' Virus Maedi-Visna

<400>

cagwcycltg ctaaygcaac tg 22

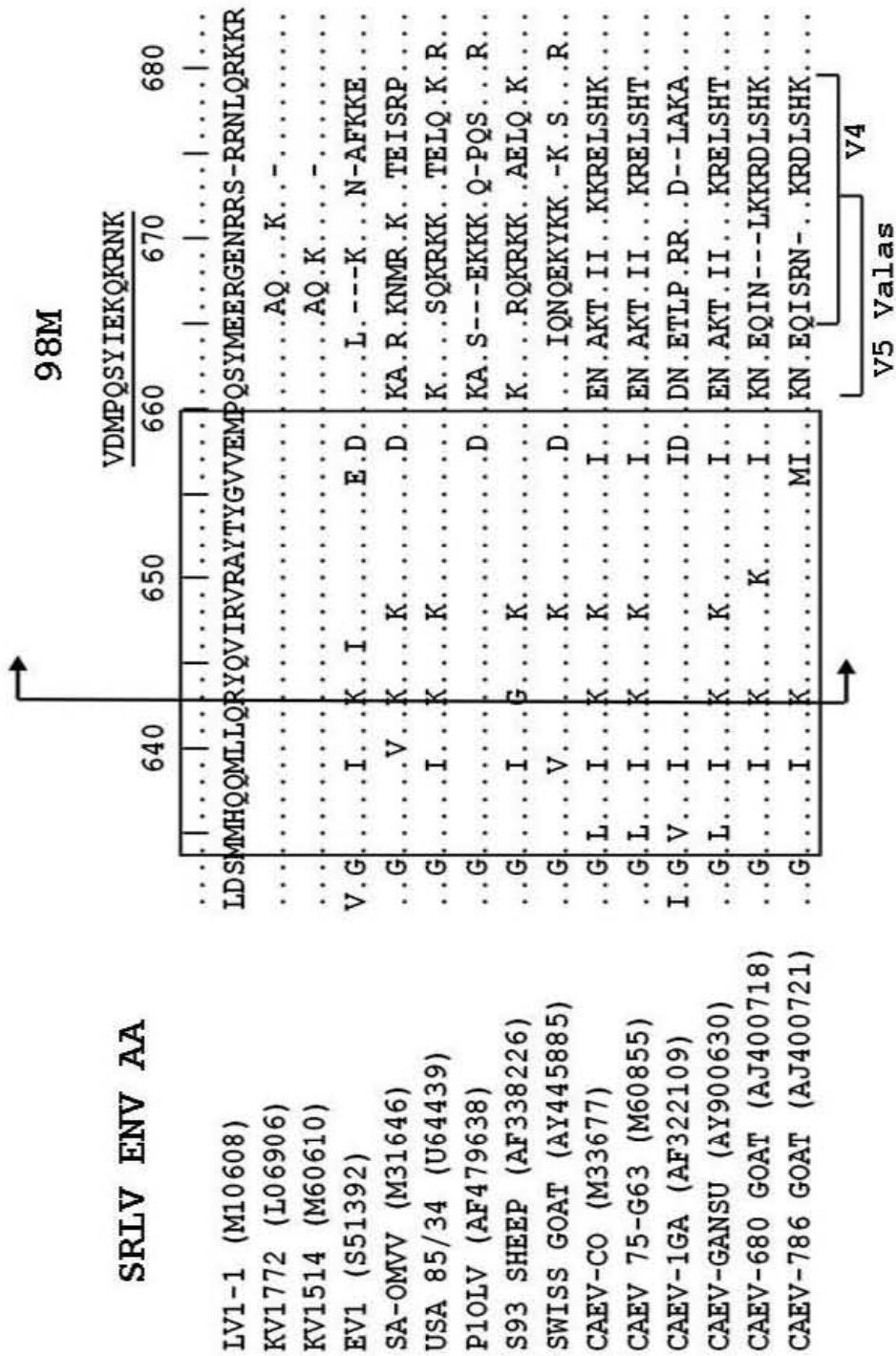
**Figura 1**

Figura 2A

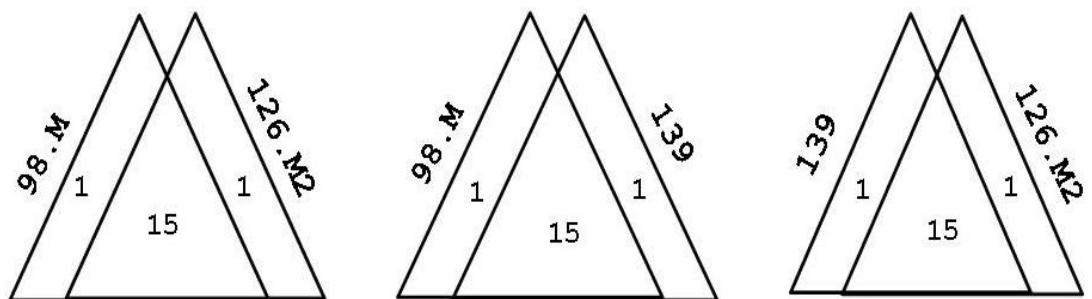


Figura 2B

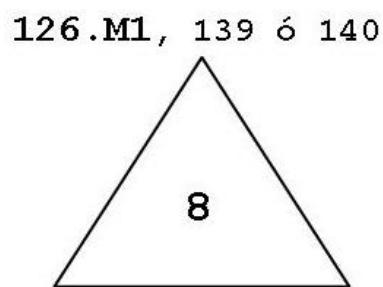


Figura 2C

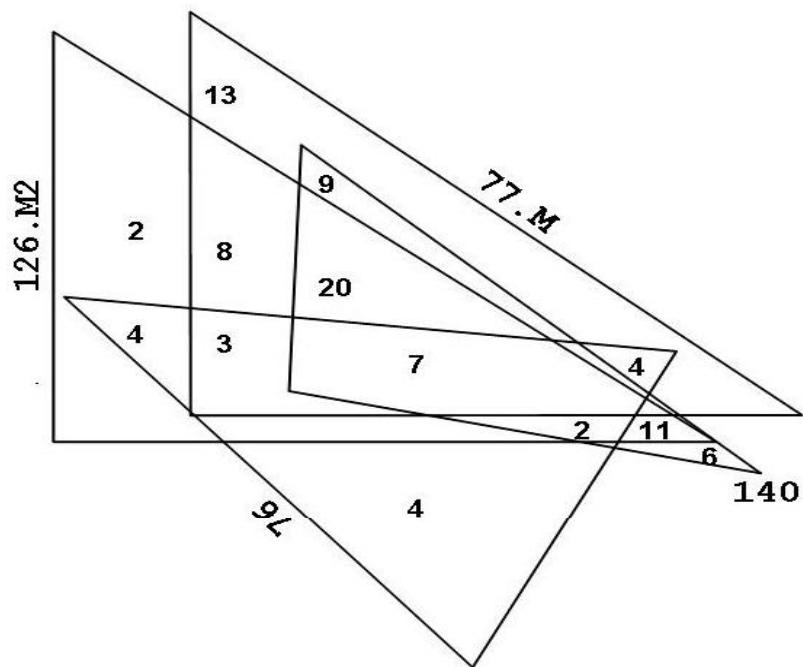


Figura 3A

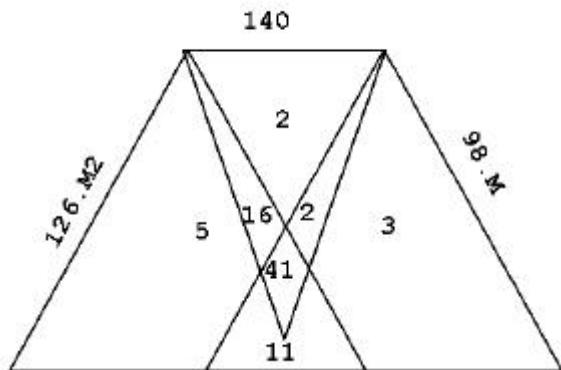


Figura 3B

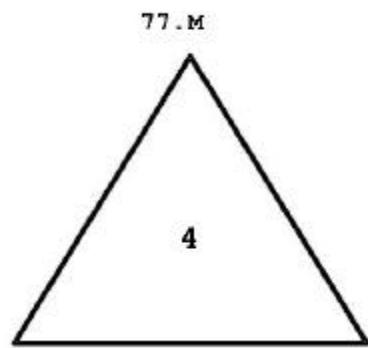


Figura 3C

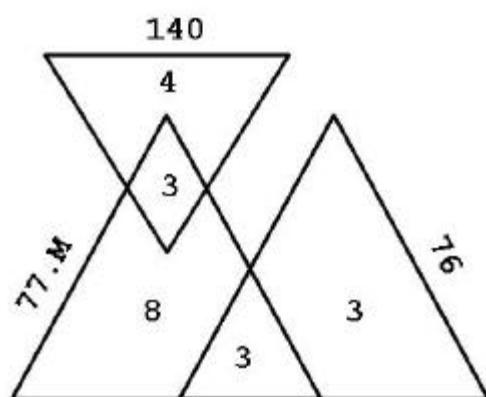
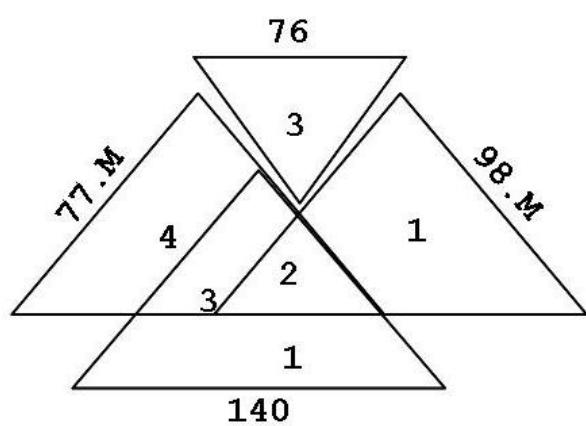


Figura 3D





OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

(21) N.º solicitud: 201031774

(22) Fecha de presentación de la solicitud: 30.11.2010

(32) Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

(5) Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	66) Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	EP 0953574 A1 (INNOGENETICS N.V.) 03.11.1999, SEQ ID nºs 2, 3, 10; reivindicaciones.	1-23
A	LACERENZA, D. et al. "Characterization of an immunodominant epitope of small ruminant lentivirus (SRLV) nucleoprotein". VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY. 15.10.2008. Vol. 125, N°. 3-4, páginas 361 - 367; todo el documento, especialmente figura 1, péptido B7.	1-23
A	REINA, R. et al. "Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E". VETERINARY MICROBIOLOGY. 18.09.2009. Vol. 138, N°. 3-4, páginas 251 - 257; apartado 2.2, SEQ ID nº 5.	1-23
A	REINA, R. et al. "Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain". VIRUS RESEARCH. 01.11.2006. Vol. 121, N°. 2, páginas 189 - 198; todo el documento.	1-23

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe 30.08.2012	Examinador M. Novoa Sanjurjo	Página 1/4
--	---------------------------------	---------------

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07K14/155 (2006.01)

G01N33/569 (2006.01)

G01N33/68 (2006.01)

A61K39/12 (2006.01)

C07K16/10 (2006.01)

C12Q1/68 (2006.01)

A61P37/04 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07K, G01N, A61K, C12Q, A61P

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, REGISTRY, HCAPLUS, EMBL, BIOSIS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 30.08.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-23 Reivindicaciones	SI NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-23 Reivindicaciones	SI NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

Consideraciones:

Péptidos derivados de proteínas de lentivirus de pequeños rumiantes (Maedi-Visna y virus de la artritis encefalitis caprina), aislados en rebaños de la Comunidad de Castilla-León. Los péptidos de la invención, se utilizan en un método de diagnóstico y para obtener vacunas para tratar la infección provocada por dichos virus.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	EP 0953574 A1 (INNOGENETICS N.V.)	03.11.1999
D02	LACERENZA, D. et al. "Characterization of an immunodominant epitope of small ruminant lentivirus (SRLV) nucleoprotein". VETERINARY IMMUNOLOGY AND IMMUNOPATHOLOGY. 15.10.2008. Vol. 125, N°. 3-4, páginas 361 - 367; todo el documento, especialmente figura 1, péptido B7.	
D03	REINA, R. et al. "Development of specific diagnostic test for small ruminant lentivirus genotype E". VETERINARY MICROBIOLOGY. 18.09.2009. Vol. 138, N°. 3-4, páginas 251 - 257; apartado 2.2, SEQ ID n° 5.	
D04	REINA, R. et al. "Molecular characterization and phylogenetic study of Maedi Visna and Caprine Arthritis Encephalitis viral sequences in sheep and goats from Spain". VIRUS RESEARCH. 01.11.2006. Vol. 121, N°. 2, páginas 189 - 198; todo el documento.	

El documento D01, describe los péptidos de SEQ ID n°s 9 y 10, utilizados en la composición de las reivindicaciones 7-10. Los péptidos se utilizan biotinilados y en combinación con otros péptidos o proteínas de los virus Maedi Visna y CAEV en un método de diagnóstico de las infecciones causadas por dichos virus.

El documento D02, presenta la caracterización del epítope inmunodominante de la nucleoproteína de un lentivirus de pequeños rumiantes (SRLV).

El documento D03, describe el desarrollo de un test de diagnóstico específico para el genotipo E de SRLV.

El documento D04, presenta la caracterización molecular y filogenética de secuencias de los virus Maedi Visna y CAEV de rebaños de ovejas y cabras de España.

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración**NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA**

Los péptidos que forman parte de la invención, la composición peptídica en la que están presentes y su uso en un método de detección de una infección producida en rebaños de ovejas y cabras, por alguna estirpe española de lentivirus de pequeños rumiantes LVPR, no se han descrito previamente en el estado de la técnica.

Los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica y no se consideran de particular relevancia, ya que para una persona experta en la materia, no sería obvio aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención tal y como se menciona en las reivindicaciones 1-23. Por lo tanto, el objeto de la presente solicitud cumple los requisitos de novedad y actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6 y 8 de la Ley de Patentes 11/1986.