



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 319 242**

⑫ Número de solicitud: 200503163

⑬ Int. Cl.:

C12N 1/10 (2006.01)

C07K 16/20 (2006.01)

A61K 35/68 (2006.01)

A61K 39/012 (2006.01)

⑭

PATENTE DE INVENCION

B1

⑮ Fecha de presentación: **23.12.2005**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **05.05.2009**

Fecha de la concesión: **18.11.2009**

⑰ Fecha de anuncio de la concesión: **01.12.2009**

⑱ Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.12.2009

⑲ Titular/es: **LABORATORIOS HIPRA, S.A.**
Avda. La Selva, 135
17170 Amer, Girona, ES

⑳ Inventor/es: **Ortega Mora, Luis Miguel;**
Collantes Fernández, Esther;
Rojo Montejo, Silvia;
Álvarez García, Gema y
Regidor Cerrillo, Javier

㉑ Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

㉒ Título: **Aislado avirulento de *Neospora caninum* y sus usos.**

㉓ Resumen:

Aislado avirulento de *Neospora caninum* y sus usos.

La presente invención se refiere a un nuevo aislado de *Neospora caninum* y a los extractos que pueden obtenerse del mismo. Dicho aislado presenta un alto grado de atenuación, que lo hace apropiado para el desarrollo de vacunas frente a la neosporosis, y de pruebas de diagnóstico para la detección de la infección por *Neospora caninum* en animales. También se describen composiciones farmacéuticas en las que se emplean dicho aislado o extractos del mismo para la prevención y el tratamiento de las infecciones causadas por *Neospora caninum* en animales.

ES 2 319 242 B1

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

DESCRIPCIÓN

Aislado avirulento de *Neospora caninum* y sus usos.

5 **Campo de la técnica**

La presente invención se refiere a un nuevo aislado de *Neospora caninum* y a sus extractos, a composiciones farmacéuticas para la prevención y el tratamiento de la neosporosis en animales, y al desarrollo de pruebas de diagnóstico para la detección de la infección por *Neospora caninum* en los mismos.

10 **Estado de la técnica anterior**

Neospora caninum es un parásito de la familia *Sarcocystidae* perteneciente al phylum Apicomplexa, dentro del cual se agrupan algunos de los organismos causantes de enfermedad más importantes conocidos por el hombre. En este grupo se incluyen géneros como *Plasmodium*, *Babesia*, *Cryptosporidium*, *Eimeria* y *Toxoplasma*.

N. caninum ha sido implicado como agente productor de aborto y mortalidad neonatal en el ganado bovino, aunque la infección también ha sido descrita en otros ungulados y cánidos, como el coyote y el perro, que actúan como hospedadores definitivos en el ciclo biológico de este parásito. Sin lugar a dudas, destaca la importancia de esta enfermedad en el ganado bovino y en el perro.

La neosporosis bovina está considerada como una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita y representa una de las causas más frecuentes de fallo reproductivo en los diversos países donde se ha estudiado, entre ellos España.

La manifestación clínica más importante de la infección es el aborto en las hembras gestantes que tiene lugar generalmente entre el tercer y noveno mes de gestación. En relación con la transmisión de la enfermedad, destaca la importancia de la transmisión congénita y la importancia relativamente escasa de la transmisión postnatal.

En cuanto al ciclo biológico de *N. caninum*, hasta la fecha se han descrito tres estadios:

- 30 - los ooquistes que son eliminados en las heces del hospedador definitivo, y que son capaces de infectar al hospedador tras su ingestión, al producirse un proceso de desenquistamiento y liberación de los esporozoítos infectivos.
- 35 - los taquizoítos, responsables de la fase aguda de la infección que se multiplican en las células hospedadoras rápidamente, produciendo la lisis celular, lesiones tisulares y su propagación a otros tejidos, y
- 40 - los bradizoítos, que se multiplican lentamente y se encuentran formando quistes tisulares en las células hospedadoras, y son responsables de la fase crónica de la infección.

Los métodos de diagnóstico utilizados para detectar la infección por *N. caninum*, principalmente en bovinos adultos, están constituidos por técnicas basadas en la detección de anticuerpos séricos específicos frente al parásito.

Para ello, se han diseñado diferentes pruebas serológicas que engloban la inmunofluorescencia indirecta (IFI), ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) e inmunoblot.

Los antígenos utilizados en estas pruebas serológicas proceden de taquizoítos obtenidos en cultivos celulares de aislados bovinos y caninos de *N. caninum*. Dichos taquizoítos se utilizan de diversas formas: enteros, extractos celulares obtenidos a partir de los mismos, y proteínas antigénicas recombinantes o purificadas por afinidad a partir de extractos celulares de taquizoítos.

En la solicitud de patente PCT WO-A-97/39009 se describe un método para diagnosticar la neosporosis en el que se emplea una proteína antigénica derivada de taquizoítos de *N. caninum*.

Se debe tener en cuenta que aunque un resultado serológico positivo ayuda a identificar un animal adulto infectado, un resultado negativo no descarta definitivamente la infección.

Diferentes estudios han demostrado que los anticuerpos séricos frente a *N. caninum* pueden fluctuar en función de la edad y el estado de gestación en bovinos, lo que dificulta enormemente la interpretación de los resultados. Subsiste, pues, la necesidad de disponer de métodos de diagnóstico alternativos para detectar la infección por *N. caninum*.

En el estado de la técnica se describen diversos productos vacunales para la protección frente a neosporosis que incluyen vacunas inactivadas, vacunas desarrolladas a partir de proteínas antigénicas recombinantes o de ADN, y vacunas vivas.

En la solicitud de patente WO-A-99/20303 se describe una vacuna que comprende taquizoítos inactivados y el adyuvante POLYGEN, que genera una respuesta inmunológica en bovinos. En estudios posteriores se ha visto que dicha vacuna era incapaz de proteger frente al aborto en reproductoras gestantes experimentalmente infectadas. Ac-

tualmente, es la única vacuna frente a *N. caninum* registrada en los Estados Unidos de Norteamérica, y se comercializa bajo el nombre de NEOGUARD.

En la solicitud de patente PCT WO-A-95/25541 se describe una vacuna contra neosporosis que comprende cultivos celulares de taquizoítos de un aislado de *Neospora caninum*.

En la solicitud de patente EP-A-0898969 se propone una vacuna que incluye un homogeneizado de taquizoítos de *N. caninum*, en el que no se encuentran células viables.

En la solicitud de patente EP-A-0953641 se describe una vacuna que contiene una proteína de *Neospora caninum* seleccionada entre el grupo formado por GRA1, GRA2, SAG1, MIC1 o MAG1, o un polinucleótido que codifica por dichas proteínas.

Como se describe en la solicitud de patente WO-A-2004/026903, el principal inconveniente de las vacunas inactivadas es que a menudo no proporcionan una inmunidad celular suficiente, requieren agentes adyuvantes, no proporcionan inmunidad local, y son peligrosas si la inactivación no es total.

En la solicitud de patente EP-A-0841392 se describe una vacuna que comprende células vivas de mutantes termosensibles de *N. caninum* que son capaces de prevenir el desarrollo de síntomas clínicos asociados a la neosporosis en una prueba de desafío en un modelo experimental murino.

Como se describe en la solicitud de patente WO-A-2004/026903, las vacunas vivas atenuadas presentan una serie de ventajas como son: la activación de todas las fases del sistema inmunitario, la inducción de IgG humorales y de IgA locales, la generación de respuestas inmunológicas frente a múltiples antígenos protectores, y proporcionar una inmunidad más duradera. Entre las desventajas cabe destacar la dificultad para establecer el nivel apropiado de atenuación y la posibilidad de reversión a la virulencia.

De ahí la importancia de la identificación y aislamiento de parásitos que presentan un alto grado de atenuación de forma natural.

En los estudios comparativos de las propiedades biológicas de diferentes aislados se ha observado la existencia de variabilidad, que incluye diferencias de patogenicidad y perfiles genéticos, lo que implica que no todos los aislados de *N. caninum* presentan las mismas propiedades o comportamiento biológico.

Por ejemplo, en Atkinson *et al.*, 1999, Parasitology 118 (Pt 4):363-370, y en Miller *et al.*, 2002, Aust Vet J. 80(10):620-625, se utilizó un modelo murino experimental que puso de manifiesto la existencia de diferencias en la virulencia de los aislados denominados Nc-SweB1, Nc-1 y Nc-Nowra frente al aislado denominado Nc-Liv, un parásito que produce signos clínicos más graves.

En la solicitud de patente PCT WO-A-02/103430 se describen vacunas que comprenden taquizoítos vivos de un aislado de *Neospora* denominado Nc-Nowra. Dicho parásito se aisló en Australia, y presenta una patogenicidad atenuada de forma natural.

Teniendo en cuenta que no se encuentra disponible ningún tratamiento farmacológico eficaz de la neosporosis, subsiste la necesidad de disponer de una vacuna que pueda inducir una respuesta inmunológica apropiada para prevenir y tratar la neosporosis, y que no presente los inconvenientes de las vacunas mencionadas.

Objeto de la invención

Los autores de la invención han aislado e identificado una nueva cepa de *Neospora caninum* que se muestra atenuada de forma natural, y que resulta apropiada para la preparación de composiciones farmacéuticas y el desarrollo de métodos de diagnóstico.

El objeto de la presente invención es un parásito aislado que presenta un alto grado de atenuación natural.

En un segundo aspecto la invención tiene también por objeto un cultivo celular biológicamente puro infectado por el aislado de la invención.

En un tercer aspecto la invención tiene también por objeto un anticuerpo que reacciona específicamente contra un antígeno procedente del aislado de la invención.

En un cuarto aspecto la invención tiene también por objeto un polipéptido obtenido a partir del aislado de la invención.

En un quinto aspecto la invención tiene también por objeto un polinucleótido obtenido a partir del aislado de la invención.

En un sexto aspecto la invención tiene también por objeto una vacuna que comprende el aislado de la invención, un extracto del mismo, o una mezcla de ambos.

En un séptimo aspecto la invención tiene también por objeto el uso del aislado de la invención para preparar una vacuna para el tratamiento y/o prevención de la neosporosis en animales.

En un octavo aspecto la invención tiene también por objeto el uso de anticuerpos que reaccionan específicamente contra un antígeno procedente del parásito aislado de la invención para preparar un medicamento para el tratamiento de una infección y/o enfermedad causada por *Neospora caninum* en animales.

En un noveno aspecto la invención tiene también por objeto el uso de antígenos procedentes del aislado de la invención para detectar la infección por el parásito *Neospora caninum* en animales, a partir de una muestra biológica.

En un décimo aspecto la invención también tiene por objeto el uso de anticuerpos que reaccionan específicamente contra un antígeno procedente del parásito aislado de la invención para detectar la infección por el parásito *Neospora caninum* en animales, a partir de una muestra biológica.

En un undécimo aspecto la invención tiene también por objeto el uso de polinucleótidos obtenidos a partir del aislado de la invención para detectar la presencia de ácidos nucleicos de *Neospora caninum* en animales, a partir de una muestra biológica.

Descripción de las figuras

Figura 1

En las Figuras 1A a 1F se muestran las secuencias nucleotídicas de ADN de cada uno de los 13 microsatélites amplificados y secuenciados del aislado objeto de la invención Nc-Spain 1H. Figura 1A: A. MS1A (SEQ. ID. NO.:1), B. MS1B (SEQ. ID. NO.:2); Figura 1B: C. MS2 (SEQ. ID. NO.:3), D. MS3 (SEQ. ID. NO.:4); Figura 1C: E. MS4 (SEQ. ID. NO.:5), F. MS5 (SEQ. ID. NO.:6); Figura 1D: G. MS6A y MS6B (SEQ. ID. NO.:7), H. MS7 (SEQ. ID. NO.:8); Figura 1E: I. MS8 (SEQ. ID. NO.:9), J. MS 10 (SEQ. ID. NO.: 10); y Figura 1F: K. MS 12 (SEQ. ID. NO.:11) y M. MS21 (SEQ. ID. NO.:12).

Figura 2

En la Figura 2 se muestra la valoración de la respuesta inmune humoral en el modelo de infección experimental murino del aislado Nc-Spain 1H. En ordenadas se representan los títulos de IgG determinados por la técnica IFI en los días 8, 16 y 32 post-inoculación en ratones que fueron inoculados con 10^5 , 10^6 y 10^7 taquizoítos del aislado Nc-Spain 1H. Las barras representan la mediana, y los cuartiles 25% y 75% para cada caso.

Figura 3

En las Figuras 3A, 3B y 3C se presenta la valoración de la respuesta inmune humoral en el modelo de infección experimental murino del aislado Nc-Spain 1H. En ordenadas se representa la densidad óptica determinada a 450 nm, y que es una medida de los anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos frente a *N. caninum* determinados por ELISA en los días 8, 16 y 32 post-inoculación producidos en los ratones de los Grupos A (Figura 3A), B (Figura 3B), y C (Figura 3C) que fueron inoculados con 10^5 , 10^6 y 10^7 taquizoítos del aislado Nc-Spain 1H, respectivamente. Las barras representan la mediana, y los cuartiles 25% y 75%.

Figura 4

En la Figura 4 se muestra la valoración de la respuesta inmune celular en el modelo de infección experimental bovino del aislado Nc-Spain 1H. En ordenadas se encuentra la densidad óptica determinada a 450 nm, que es una medida de los valores de IFN- γ producidos por los animales inoculados con 10^7 taquizoítos del aislado de referencia Nc-1, del aislado Nc-Spain 1H y PBS (grupo testigo). En abscisas se muestran los días post-inoculación.

Figura 5

En la Figura 5 se presenta la valoración de la respuesta inmune humoral en el modelo de infección experimental bovino del aislado Nc-Spain 1H. En ordenadas se representa la densidad óptica determinada a 450 nm (OD), que es una medida de los valores medios de los anticuerpos IgG anti-*N. caninum* producidos por los animales bovinos inoculados con 10^7 taquizoítos del aislado de referencia Nc-1, del aislado Nc-Spain 1H y PBS (grupo testigo). En abscisas se muestran los días post-inoculación.

Figura 6

En las Figuras 6A y 6B se muestra la valoración de la respuesta inmune humoral en el modelo de infección experimental bovino del aislado Nc-Spain 1H. En ordenadas se representa la densidad óptica determinada a 450 nm (OD), que corresponde a los valores medios de los anticuerpos IgG1 (Figura 6A) e IgG2 (Figura 6B) anti-*N. caninum*.

producidos por los animales inoculados con 10⁷ taquizoítos del aislado de referencia Nc-1, del aislado Nc-Spain 1H y PBS (grupo testigo). En abscisas se muestran los días post-inoculación.

Descripción detallada de la invención

En esta descripción cuando se habla del parásito aislado o simplemente aislado de la invención se refiere a la cepa aislada de *Neospora caninum* en cualquier estadio de su ciclo biológico que incluye taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos.

Del mismo modo cuando se habla de extractos, lisados celulares, polipéptidos y polinucleótidos obtenidos del aislado se refiere a extractos, lisados celulares, polipéptidos y polinucleótidos obtenidos del aislado de la invención en cualquier estadio de su ciclo biológico que incluye taquizoítos, bradizoítos y esporozoítos.

Nuevo parásito aislado

El objeto de la presente invención es una nueva cepa de *Neospora caninum* aislada a partir de tejido nervioso de una ternera de la raza Frisona-Holstein congénitamente infectada.

El nuevo aislado se ha denominado Nc-Spain 1H.

Dicho aislado se ha identificado y caracterizado mediante diferentes estudios *in vitro* e infecciones experimentales *in vivo* como un nuevo aislado de *Neospora caninum*.

El aislado de la invención presenta un alto grado de atenuación natural, es decir, manifiesta atenuación sin haber sido manipulado, y por ello es un candidato apropiado para el desarrollo de vacunas frente a la neosporosis, y para el desarrollo de pruebas de diagnóstico para detectar la presencia del parásito o de la infección causada por el mismo a partir de muestras biológicas de animales.

Una muestra del aislado Nc-Spain 1H se ha depositado el día 20.09.2005, de acuerdo con las provisiones del Tratado de Budapest sobre reconocimiento internacional del depósito de microorganismos a fines del procedimiento en materia de patentes, en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP) situada en el Dunstaffnage Marine Laboratory, Dunbeg, OBAN, Ar-gyll PA37 1QA, Escocia, Gran Bretaña, que le ha otorgado el número de acceso CCAP 2051/2.

Este aislado fue obtenido a partir de homogenizados del tejido nervioso (encéfalo y médula espinal) de una ternera de aptitud láctea congénitamente infectada, tal como se describe en el Ejemplo 1.

Para su identificación y caracterización se procedió a la extracción del ADN genómico de una muestra de tejido nervioso, que se sometió a una PCR anidada desarrollada para la detección específica del ADN del parásito en muestras clínicas. La amplificación específica de la región ITS-1, según se describe en Buxton *et al.*, 1998, J. Comp Pathol. 118: 267-279, confirmó la presencia de parásitos de *Neospora* en dicha muestra.

La caracterización genética del aislado de la invención se realizó empleando la tecnología de microsatélites, que resulta ser una herramienta adecuada para ser aplicada en la identificación y discriminación de los diferentes aislados de *N. caninum*, como se describe en el Ejemplo 2 de esta descripción.

Los microsatélites están constituidos por secuencias nucleotídicas sencillas de 2 a 5 nucleótidos que se repiten en tándem y que se caracterizan por un elevado polimorfismo, principalmente en función del número de repeticiones del motivo nucleotídico que presentan. Este tipo de secuencias ha sido descrito en multitud de organismos procariotas y eucariotas, incluyendo protozoos, y han sido extensamente utilizadas para el genotipado de diferentes parásitos apicomplejos como *Toxoplasma gondii* (Ajzenberg *et al.*, 2002, Int. J. Parasitol. 32:27-38), *Cryptosporidium parvum* y *Cryptosporidium hominis* (Mallon *et al.*, 2003, Infect. Genet. Evol. 3:207-218), *Plasmodium falciparum* (Anderson *et al.*, 2000, Mol. Biol. Evol. 17:1467-1482) y *Theileria parva* (Oura *et al.*, 2003, Int. J. Parasitol. 33:1641-1653).

Los resultados obtenidos al comparar diez aislados de *Neospora*, entre ellos el aislado Nc-Spain 1H de la invención, permiten concluir que todos son distintos.

La comprobación *in vivo* de que el parásito era del género *Neospora* se llevó a cabo mediante la inoculación de ratones atímicos de la estirpe BALB/c con diferentes cantidades del tejido infectado, que condujo a la aparición de signos clínicos compatibles con neosporosis. Finalmente el parásito se aisló en cultivos celulares de la línea celular MARC-145 (células de riñón de mono).

Características patogénicas e inmunogénicas del nuevo parásito aislado

La patogenicidad del aislado de la invención se ensayó en un modelo murino y bovino gestante tal como se describe más adelante en los Ejemplos 3 y 4, respectivamente.

Los ratones se dividieron en cuatro grupos, tres de los cuáles fueron inoculados con 10^5 , 10^6 y 10^7 taquizoítos del parásito Nc-Spain 1H obtenidos de cultivo celular, y el cuarto grupo (testigo) inoculado con solución tampón PBS.

Los ratones de los grupos infectados no desarrollaron signos compatibles con la infección por *Neospora*, ni mortalidad durante los 32 días que duró el experimento. Ello demuestra el alto grado de atenuación de la cepa Nc-Spain 1H.

Aunque en dichos ratones se detectó la presencia de ADN de *N. caninum* en sangre, pulmón y encéfalo, la persistencia de la misma en estos órganos fue muy inferior a la que se observa cuando se inoculan cepas virulentas de *N. caninum*, lo cual corrobora asimismo el alto grado de atenuación de esta cepa.

En el modelo bovino gestante, se inocularon novillas en el día 70 de gestación administrando por vía intravenosa 10^7 taquizoítos del aislado de referencia de *N. caninum*, Nc-1 (Dubey *et al.*, 1988, J. Am. Vet. Med. Assoc. 193:1259-63) (grupo 1), Nc-Spain 1H (grupo 2) o PBS (grupo 3). En el grupo infectado con Nc-1 se produjo la muerte fetal en 3 de las 5 novillas inoculadas. En los animales pertenecientes al grupo infectado con Nc-Spain 1H, no se observó la muerte fetal durante los 45 días que duró el experimento. Asimismo, en el grupo 2 el ADN del parásito no se detectó en los tejidos fetales y las lesiones observadas en placenta y órganos fetales fueron más leves que las encontradas en los animales infectados con Nc-1.

Los ensayos de inmunogenicidad se llevaron a cabo en un modelo murino con ratones (Ejemplo 5), y en un modelo bovino con vacas (Ejemplo 6).

En estos ensayos se pudo observar que, en los animales infectados con taquizoítos del aislado de la invención Nc-Spain 1H, se inducía la producción de anticuerpos que reaccionaban con antígenos del aislado de referencia de *N. caninum*, Nc-1. Ello demuestra la capacidad de la cepa Nc-Spain 1H de inducir una respuesta inmune específica frente a *N. caninum*.

La detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* en el plasma de ratones infectados con taquizoítos procedentes del aislado de la invención se determinó mediante las técnicas de IFI y ELISA.

Cuando se utilizó la técnica IFI, como antígenos se emplearon taquizoítos inactivados del aislado de referencia Nc-1.

La presencia de anticuerpos se detectó a partir del día 8 post-inoculación (PI) en los grupos inoculados con la dosis mayor (10^7 taquizoítos), y los títulos de IgG obtenidos por IFI variaron también en función de la dosis infectiva, obteniéndose los más elevados (1:200 - 1:400) en los ratones del grupo inoculado con la dosis mayor, tal como se observa en la Figura 2.

La detección de las inmunoglobulinas de los isotipos IgG1 e IgG2a específicas para *N. caninum* en el plasma se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto empleando como antígeno proteína del extracto soluble de taquizoítos del aislado de referencia Nc-1 de *N. caninum* obtenido por sonicación.

Se observó un aumento de los isotipos IgG2a e IgG1 a partir del día 8 PI, siendo más evidente el incremento de la inmunoglobulina IgG2a en los grupos infectados con 10^5 y 10^6 taquizoítos del aislado de la invención.

En los días 16 y 32 PI, los ratones inoculados con 10^5 y 10^6 taquizoítos tuvieron mayor concentración de IgG2a que IgG1. No obstante, en el grupo inoculado con 10^7 taquizoítos la producción de IgG1 fue predominante en el día 16.

En las Figuras 3A, 3B y 3C se muestran los resultados de las lecturas de densidad óptica a 450 nm, que es una medida de los anticuerpos IgG1 e IgG2, para los ratones infectados con 10^5 , 10^6 y 10^7 taquizoítos del aislado Nc-Spain 1H, respectivamente.

A la vista de los resultados se puede concluir que la infección de ratones con taquizoítos del aislado de la invención induce la producción de anticuerpos que reaccionan específicamente con antígenos de un aislado de referencia de *N. caninum* como es el aislado Nc-1.

En los ensayos con novillas se determinó la producción de interferón gamma (IFN- γ) como indicador de la respuesta inmune celular generada en los animales debido a la infección con taquizoítos del parásito aislado Nc-Spain 1H, y se evaluó la respuesta inmune humoral mediante la determinación por ELISA de las inmunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG2.

En los grupos infectados se detectó un incremento en los niveles de IFN- γ frente a los del grupo control en los días 5 y 12 post-inoculación, como se puede observar en la Figura 4.

En cuanto a la inmunoglobulina IgG total específica, los valores del grupo de animales infectados con taquizoítos del parásito aislado de la invención fueron superiores a los del grupo testigo, pero las diferencias no fueron significativas. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Los isotipos IgG1 e IgG2 se valoraron a partir del día en el que se observó un aumento significativo de los valores de IgG con respecto al grupo testigo.

A partir del día 12 post-inoculación, se produjo un aumento significativo de IgG1, y los mayores niveles se alcanzaron a partir del día 34, siendo estos valores estadísticamente diferentes a los valores del grupo testigo.

Los valores de IgG2 permanecieron ligeramente por encima de los del grupo testigo, pero no se encontraron diferencias significativas entre ambos. Los resultados correspondientes al isotipo IgG1 se muestran en la Figura 6A, y los del isotipo IgG2 se muestran en la Figura 6B.

A la vista de los resultados se puede concluir que la infección de novillas con taquizoítos del aislado de la invención induce la producción de anticuerpos que reaccionan específicamente con antígenos de un aislado de referencia de *N. caninum* como es el aislado Nc-1.

Consecuentemente, el aislado Nc-Spain 1 H es una cepa *N. caninum* de alto grado de atenuación que induce la producción de anticuerpos que reaccionan específicamente contra antígenos de *N. caninum*.

Cultivos celulares

También es un objeto de la invención un cultivo celular biológicamente puro infectado por el aislado de la invención.

La expresión “cultivo celular biológicamente puro” del aislado de *N. caninum* se refiere a un cultivo del aislado Nc-Spain 1H mantenido de forma continua sustancialmente libre de otros organismos salvo las células hospedadoras donde el parásito *Neospora* crece. Se considera que un cultivo es sustancialmente libre de otros organismos si tras los procedimientos de recuperación normalizados del aislado dan como resultado una preparación con al menos el 95% y, preferiblemente el 99% o más del organismo.

Preferiblemente el cultivo celular infectado es de células de riñón de mono. Entre ellas se pueden mencionar las líneas celulares MA-104, Vero, y los clones celulares C8 y MARC-145.

Anticuerpos

Forma parte también del objeto de la invención un anticuerpo que reacciona específicamente contra un antígeno procedente del aislado de la invención.

El término “anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina producida por un organismo animal capaz de unirse a un epítipo específico en un antígeno. Los anticuerpos pueden estar constituidos por una mezcla policlonal o ser anticuerpos monoclonales. También pueden estar constituidos por inmunoglobulinas intactas de origen natural o de naturaleza recombinante o fragmentos de estos anticuerpos que retienen su capacidad de reconocimiento y unión del antígeno diana y que incluyen la Fv, F(ab), y F(ab)₂, así como cadenas simples. También se pueden emplear anticuerpos formados por cadenas simples en los cuales la cadena pesada o la cadena ligera pueden estar combinadas con otras moléculas.

Preferiblemente el antígeno procedente del aislado Nc-Spain 1H se selecciona entre el grupo formado por el propio aislado, taquizoítos, bradizoítos, esporozoítos, lisados celulares, polipéptidos antigénicos, o sus mezclas.

Más preferiblemente el antígeno se selecciona entre el grupo formado por taquizoítos y polipéptidos antigénicos.

Los polipéptidos antigénicos pueden ser obtenidos a partir del propio aislado, o bien mediante tecnología recombinante a partir de polinucleótidos obtenidos a partir del aislado de la invención.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o estar constituidos por una mezcla policlonal.

Los anticuerpos monoclonales son anticuerpos idénticos porque son producidos por un solo tipo de célula del sistema inmune.

Preferiblemente el anticuerpo de la invención es monoclonal.

Los anticuerpos monoclonales pueden ser obtenidos por diferentes técnicas bien descritas en el estado de la técnica, como por ejemplo, en Harlow y Lane, 1988, “Antibodies: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Los anticuerpos de la invención son apropiados para detectar la presencia del parásito *Neospora caninum* o de la infección causada por el mismo en animales, a partir de muestras biológicas.

Polipéptidos

También forma parte del objeto de la invención un polipéptido obtenido a partir del parásito aislado de la invención.

5 En esta descripción, el término “polipéptido” incluye los polipéptidos obtenidos de los cultivos del parásito aislado de la invención, y también los polipéptidos recombinantes producidos en sistemas de expresión heterólogos tras la transcripción y traducción de polinucleótidos obtenidos a partir del parásito aislado de la presente invención en cualquier estadio de su ciclo biológico.

10 Para el aislamiento de polipéptidos antigénicos del nuevo aislado se pueden emplear las técnicas habitualmente empleadas para la purificación de proteínas o polipéptidos, tal como se describe en Scopes, 1994, “Protein Purification: Principles and Practice”, Springer-Verlag, 3rd. Ed. Entre las mismas se incluyen la precipitación selectiva utilizando agentes como el sulfato amonio, la cromatografía de columna, y métodos de inmunopurificación.

15 La secuenciación de polipéptidos y/o fragmentos de los mismos permite obtener polinucleótidos y oligonucleótidos de interés para el desarrollo de pruebas de diagnóstico, y para la expresión de polipéptidos recombinantes. Éstos se pueden modificar mediante la realización de defecciones, inserciones y sustituciones en su secuencia aminoacídica, dando lugar a polipéptidos distintos, pero que conservan su capacidad inmunogénica. Para ello se pueden emplear técnicas bien conocidas y descritas por ejemplo en Sambrook *et al.*, 1989, “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Cold Spring Harbour Publish, Cold Spring Harbour, Nueva York 2nd Ed.

Las secuencias polipeptídicas de la invención incluyen no solamente a aquellas secuencias idénticas, sino también a aquéllas sustancialmente idénticas a las mismas.

25 En esta descripción el término “idénticas” se refiere a dos o más secuencias que son la misma, mientras que la expresión “porcentaje de identidad” de secuencias para dos o más polinucleótidos y polipéptidos se refiere a dos o más secuencias que presentan un porcentaje concreto de nucleótidos o residuos aminoacídicos que son iguales, cuando éstas son alineadas para la máxima correspondencia, comparadas y este porcentaje es calculado mediante el uso de algoritmos utilizados en su comparación o por inspección visual.

30 La expresión “sustancialmente idénticas” se refiere a secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas que tienen al menos un 60%, preferiblemente un 80% y más preferiblemente entre un 90-95% de identidad en los nucleótidos o residuos aminoacídicos, cuando son comparadas, alineadas para la máxima correspondencia y su porcentaje de identidad calculado por los métodos ya mencionados. Para la comparación de secuencias, habitualmente una secuencia actúa como secuencia de referencia con la que el resto de las secuencias en estudio son comparadas. Generalmente, las secuencias son comparadas utilizando programas informáticos que calculan el porcentaje de identidad de las secuencias en estudio respecto a la secuencia de referencia en función de los parámetros establecidos en el programa. El programa BLAST es un ejemplo de los programas utilizados para calcular el porcentaje de identidad y similitud entre secuencias. El software del programa BLAST es de acceso público a través del *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

45 Los polipéptidos de la invención pueden ser de interés diagnóstico o inmunogénico. En el primer caso pueden formar parte de pruebas de inmunoensayo como antígeno para la detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum*, y en el segundo caso pueden formar parte de composiciones inmunogénicas para la prevención y el tratamiento de las infecciones causadas por *Neospora*.

Polinucleótidos

50 En otro aspecto, el objeto de la invención también comprende un polinucleótido obtenido a partir del parásito aislado de la invención.

En esta descripción el término “polinucleótido” hace referencia a moléculas de los ácidos nucleicos ADN o ARN.

55 Los polinucleótidos de la invención también incluyen aquellas moléculas nucleotídicas que pueden ser “sustancialmente idénticas” a las secuencias de los mismos, como ya se ha descrito anteriormente.

De hecho, un número variable de secuencias polinucleotídicas que son transcritas y traducidas pueden producir polipéptidos funcionales idénticos debido a la degeneración del código genético.

60 Dos secuencias polinucleotídicas también se consideran sustancialmente idénticas si hibridan la una con la otra en condiciones de alta especificidad. Estas condiciones dependen normalmente de la secuencia y serán diferentes en función de las condiciones ensayadas. Por ejemplo, las condiciones habituales para *Southern blot* incluyen el lavado a temperatura ambiente con el tampón 2xSSC, 0.1% SDS.

65 Los polinucleótidos de la invención se pueden obtener a partir del parásito aislado en cualquier estadio del ciclo del parásito mediante el empleo de técnicas descritas en el estado de la técnica, y bien conocidas por el experto en la materia.

Por ejemplo el ADN genómico o ARN total o mensajero se pueden extraer y purificar mediante la lisis celular y su posterior extracción con fenol/cloroformo.

Se pueden elaborar genotecas representativas de ADN genómico o ADN complementario a partir del tratamiento del ADN genómico con enzimas de restricción, o bien mediante la producción de ADN complementario a partir del ARN mensajero y su posterior inserción en vectores de amplificación de células procariotas, como por ejemplo *Escherichia coli*.

Como se describe en Innis *et al.*, 1990, "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, es bien conocido que la tecnología de la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) se puede emplear, entre otras aplicaciones, para amplificar las secuencias nucleotídicas de los genes requeridos a partir de ARN mensajero, ADN genómico o genotecas para su posterior expresión heteróloga, o bien como método de diagnóstico mediante la amplificación de ADN específico de *Neospora* a partir del ADN de una muestra biológica, o bien para la obtención de sondas nucleotídicas que permitirán detectar la presencia de ARN mensajero o ADN del parásito en muestras biológicas.

Los polinucleótidos obtenidos a partir de los cultivos del nuevo aislado se pueden emplear para la expresión de proteínas recombinantes. Las secuencias polinucleotídicas utilizadas en la expresión heteróloga de polipéptidos pueden ser modificadas con el fin de obtener variaciones en estos polipéptidos para facilitar su expresión y/o purificación.

De acuerdo con métodos conocidos en el estado de la técnica, los ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos de interés son introducidos en sistemas heterólogos de expresión adecuados, seguido de la inducción del sistema para producir grandes cantidades de proteína. Entre los sistemas heterólogos se incluyen células procariotas, como por ejemplo *E. coli*, levaduras, como por ejemplo *Sacharomyces cerevisiae*, *Schizosacharomyces pombe*, y *Pichia pastoris*, y líneas celulares de mamíferos, como por ejemplo CHO, HEK, COS, o de insecto, las cuales pueden expresar grandes cantidades del polipéptido de interés que posteriormente es sometida a un proceso de purificación.

La introducción del material genético en la célula hospedadora o sistema de expresión del polipéptido se puede llevar a cabo por multitud de técnicas entre las que se encuentran: transfección con sales de calcio, esferoplastos, electroporación, liposomas, y vectores víricos.

El vector utilizado para la inclusión del material genético dentro de la célula, puede ser cualquiera de los vectores de expresión convencionales desarrollados para la expresión de proteínas en células procariotas y eucariotas. Éstos presentan una unidad de transcripción o cassette de expresión requerido para la transcripción y posterior traducción del ADN que codifica el polipéptido de interés por la célula hospedadora.

Tras el crecimiento de las células con el ADN recombinante y la expresión del polipéptido, tanto el medio de cultivo como las células pueden ser recogidas para la purificación del polipéptido heterólogo. Los métodos de purificación y concentración del polipéptido expresado incluyen entre otros adsorción, ultrafiltración, ultracentrifugación, fraccionamiento mediante sulfato amónico, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de afinidad por cola de Histidinas (His6).

Los polipéptidos obtenidos por tecnología recombinante, una vez purificados se pueden emplear para la obtención de anticuerpos, para el desarrollo de pruebas de diagnóstico y para la elaboración de formulaciones farmacéuticas inmunogénicas.

Los polinucleótidos de la invención pueden emplearse en la expresión heteróloga de polipéptidos de *Neospora* de interés diagnóstico o inmunogénico, y como sondas de diagnóstico para detectar la presencia de ADN de *Neospora* en muestras biológicas.

Uso del nuevo aislado en composiciones inmunogénicas

La invención también tiene por objeto una vacuna que comprende el aislado de la invención depositado con el número de acceso CCAP 2051/2, un extracto del mismo, o una mezcla de ambos.

Dicha vacuna es una composición farmacéutica que puede ser utilizada para el tratamiento y la prevención de infecciones y enfermedades provocadas por *N. caninum*.

En las vacunas, el aislado de la invención preferiblemente está en forma de aislado vivo atenuado, inactivado, o fijado, en cualquier estadio de su ciclo biológico.

La cepa de *Neospora caninum* de la invención se puede emplear directamente para preparar las vacunas frente a neosporosis, ya que presenta un alto grado de atenuación. No obstante, también se puede atenuar adicionalmente empleando técnicas de atenuación que son bien conocidas por el experto en la materia.

El extracto del aislado de la invención se puede obtener en cualquier estadio de su ciclo biológico.

ES 2 319 242 B1

Preferiblemente dicho extracto se selecciona entre el grupo formado por lisados celulares, polipéptidos antigénicos y polinucleótidos que codifican polipéptidos antigénicos.

Los lisados celulares se pueden obtener mediante técnicas bien conocidas por el experto en la materia, como son por ejemplo, la sonicación, y la homogeneización.

Los polipéptidos antigénicos se pueden extraer del aislado de la invención, y pueden estar purificados de forma parcial o total, como ya se ha descrito anteriormente.

Como ya se ha descrito, los polipéptidos antigénicos también se pueden preparar mediante técnicas de ADN recombinante, de la misma forma que los polinucleótidos que codifican polipéptidos antigénicos.

Además, dichos polinucleótidos pueden ser donados en vectores víricos capaces de transfectar células huésped en animales. Los virus atenuados vivos, de la familia vaccinia o adenovirus, son alternativas convenientes para la generación de vacunas de ADN debido a su bajo coste de producción y la facilidad de su transporte y administración. Los polinucleótidos también pueden ser incorporados a vectores de vacunas no virales.

Las vacunas que contienen el aislado de la invención o un extracto del mismo como agente inmunógeno son habitualmente preparadas como inyectables en soluciones líquidas o suspensiones, o en forma sólida, para su posterior reconstitución en solución o suspensión previamente a su administración.

La vacuna también puede ser formulada como emulsión o se puede encapsular el agente inmunógeno en liposomas, o cualquier sistema apropiado. En su formulación el agente inmunógeno puede ir combinado con excipientes de uso farmacéutico habitual compatibles con el mismo, como por ejemplo: agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y sus combinaciones.

La vacuna también puede llevar agentes humectantes o emulsionantes, reguladores del pH, conservantes y/o adyuvantes que aumentan la efectividad de la vacuna como por ejemplo: compuestos de aluminio (como por ejemplo hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, y sulfato potásico de aluminio), sulfato de berilio, sílice, caolín, carbón, emulsiones agua/aceite o aceite/agua, endotoxina bacteriana, *Corynebacterium parvum* (*Propionobacterium acnes*), *Bordetella pertussis*, poliribonucleótidos, alginato sódico, lanolina, vitamina A, saponinas, liposomas, DEAE-dextrano, copolímeros, y otros adyuvantes sintéticos.

También se pueden incorporar a la vacuna citoquinas y/u otros inmunomoduladores como IFN- γ .

La concentración del agente inmunógeno y del compuesto adyuvante puede variar dentro de un amplio margen en función de que la cantidad de ambos sea efectiva. Una vez preparada la vacuna, ésta se puede envasar en contenedores estériles y ser almacenada de la forma adecuada para su mantenimiento de forma estable durante largos periodos de tiempo, por ejemplo a baja temperatura o mediante un proceso de liofilización.

Las vacunas que se presentan como inyectables se pueden administrar parenteralmente, mediante la inyección subcutánea, intradérmica, endovenosa, o intramuscular.

También se pueden emplear otras formulaciones para administrar la vacuna como por ejemplo supositorios o formulaciones orales, por ejemplo cápsulas o comprimidos. En estos casos las técnicas de formulación, los adyuvantes, y las sustancias auxiliares apropiadas son bien conocidos por el experto en la materia.

Las vacunas de la presente invención pueden ser administradas de forma preventiva a animales sensibles a la infección o la enfermedad con el fin de inducir una respuesta inmune más eficaz frente al parásito.

También se puede administrar la vacuna para el tratamiento de la infección o de la enfermedad una vez han aparecido los primeros síntomas.

Para la inmunización de bovinos y otros animales pueden ser efectivos diversos regímenes de vacunación. Así, por ejemplo, el ganado bovino puede ser vacunado durante el periodo reproductivo para prevenir el aborto y reducir la posibilidad de infecciones congénitas.

También forma parte de la invención el uso del aislado de la invención para preparar una vacuna para el tratamiento y/o prevención de la neosporosis en animales.

Forma parte también del objeto de la invención el uso de anticuerpos que reaccionan específicamente contra un antígeno procedente de la cepa de la invención para preparar un medicamento para el tratamiento de una infección y/o enfermedad causada por *N. caninum* en animales.

Uso del nuevo aislado en técnicas de diagnóstico

En esta descripción “muestra biológica” se refiere a cualquier muestra obtenida de organismos vivos o muertos. Ejemplos de muestras biológicas son los fluidos biológicos (sangre, suero, plasma, orina, semen, líquido ascítico,

líquido cerebroespinal y fluidos fetales), las muestras de tejidos (originarios de encéfalo, médula espinal, pulmón, corazón, hígado, y placenta) y los cultivos celulares.

5 Forma parte también del objeto de la invención el uso de antígenos procedentes del aislado de la invención para detectar la infección por el parásito *Neospora caninum* en animales, a partir de una muestra biológica.

Preferiblemente el antígeno del parásito aislado Nc-Spain 1H se selecciona entre el grupo formado por el propio aislado, taquizoítos, bradizoítos, esporozoítos, lisados celulares, polipéptidos antigénicos, o sus mezclas.

10 Más preferiblemente el antígeno empleado se selecciona entre el grupo formado por taquizoítos y polipéptidos antigénicos.

Los polipéptidos antigénicos pueden ser obtenidos a partir del propio aislado, o bien mediante tecnología recombinante a partir de polinucleótidos obtenidos a partir del aislado de la invención.

15 Para detectar la infección por el parásito *Neospora* en animales a partir de una muestra biológica se pueden emplear procedimientos para la detección de la respuesta inmunológica generada por la infección por *Neospora*, bien descritos en textos de inmunología, como por ejemplo en Brostoff, Male, y Roitt, 2000, Inmunología, 5ª Edición, Editorial Harcourt Brace.

20 Así, por ejemplo, el antígeno de la invención se puede inmovilizar en una superficie sólida, y el complejo antígeno-anticuerpo se puede detectar usando anticuerpos anti-inmunoglobulina de la especie de la que procede la muestra en estudio marcados con moléculas fluorescentes o que presentan actividad enzimática.

25 También forma parte del objeto de la invención el uso de anticuerpos que reaccionan específicamente contra un antígeno procedente del parásito aislado de la invención para detectar la presencia del parásito *Neospora* en una muestra biológica.

30 Como ya se ha descrito anteriormente, preferiblemente el antígeno procedente del parásito aislado Nc-Spain 1H se selecciona entre el grupo formado por el propio aislado, taquizoítos, bradizoítos, esporozoítos, lisados celulares, polipéptidos antigénicos obtenidos del mismo aislado, polipéptidos antigénicos obtenidos mediante tecnología recombinante a partir de polinucleótidos obtenidos del mismo aislado, o sus mezclas.

35 Más preferiblemente el antígeno empleado se selecciona entre el grupo formado taquizoítos y polipéptidos antigénicos.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales o estar constituidos por una mezcla policlonal.

40 Preferiblemente el anticuerpo de la invención es monoclonal.

Los inmunoensayos utilizados para medir los anticuerpos anti-*Neospora* o antígenos del parásito pueden emplear ensayos de unión antígeno-anticuerpo competitivos o no competitivos.

45 En los ensayos competitivos, la muestra a analizar (por ejemplo, anticuerpos anti-*N. caninum*) compete con otro anticuerpo marcado (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal anti-*N. caninum*) por su unión específica a un antígeno (por ejemplo, proteína aislada de *N. caninum*) unida a una superficie sólida. La concentración del anticuerpo marcado unido al antígeno será inversamente proporcional a la cantidad de anticuerpo libre presente en la muestra.

50 Los ensayos no competitivos son los más habituales, y en ellos los componentes de la muestra a analizar que indican la presencia del parásito se unen específicamente a dos reactivos que forman parte de la prueba. Uno de ellos es utilizado para la captura de los componentes de la muestra y permanece unido a una superficie sólida. El segundo está marcado y es utilizado para medir o detectar la presencia de los complejos previamente formados.

55 En otra realización, el inmunoensayo se puede llevar a cabo en fase líquida y mediante una variedad de métodos que permiten separar el complejo formado de los componentes de la muestra no unidos. Estos métodos incluyen por ejemplo inmunoprecipitación, cromatografía de columna, adsorción, y adición de partículas magnéticas tapizadas con un reactivo capaz de unirse al complejo.

60 También se puede utilizar la técnica de inmunoblot para detectar la presencia de anticuerpos específicos frente a *Neospora* en una muestra biológica. Esta técnica es aplicada habitualmente para detectar la presencia de anticuerpos específicos de la muestra frente a una proteína en particular. Dicha técnica implica la separación de las proteínas por electroforesis en geles de acrilamida en función de su tamaño y/o punto isoelectrónico en un gradiente de pH, la transferencia de las proteínas separadas a una superficie sólida adecuada (membrana de nitrocelulosa o nylon) y la incubación de las proteínas transferidas con la muestra que contiene los anticuerpos. Esto permite la unión específica de los anticuerpos presentes en la muestra a las respectivas proteínas presentes, formando unos complejos antígeno-anticuerpo que son detectados mediante el empleo de anticuerpos anti-inmunoglobulina marcados de los animales de origen de la muestra.

El marcaje de los reactivos utilizados en las pruebas anteriormente descritas puede efectuarse mediante marcaje radiactivo con los isótopos H^3 , I^{125} , C^{14} o P^{32} o mediante la unión a ligandos fluoróforos, como por ejemplo, fluoresceína y rodamina, quimioluminiscentes, como por ejemplo, luciferasa, enzimas, como por ejemplo fosfatasa, esterasas, peroxidasa, al complejo biotina-estreptavidina y otros anticuerpos que pueden actuar como diana de unión para un compuesto marcado. Aún así, en algunos ensayos no es necesario el uso de compuestos marcados. Por ejemplo, en ensayos de aglutinación desarrollados para detectar la presencia de anticuerpos, el antígeno se presenta recubriendo partículas que se aglutinan si existe la presencia de anticuerpos específicos frente a ese antígeno, detectándose la formación de los complejos por la simple inspección visual o visualización microscópica.

El objeto de la invención también incluye el uso de polinucleótidos obtenidos a partir de la cepa de la invención para detectar la presencia de ácidos nucleicos específicos de *Neospora caninum* en animales, a partir de una muestra biológica.

Existe una variedad de métodos para la detección del ADN y ARN mediante técnicas de hibridación, entre las que se encuentra la PCR, como se describe en Sambrook *et al.*, 1989, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbour Publish., Cold Spring Harbour, Nueva York 2nd Ed.

Otro de los métodos utilizados es el *Southern blot*, en el que el ADN genómico obtenido a partir de la muestra es digerido con enzimas de restricción, separado en geles de agarosa, desnaturalizado y transferido a membranas. Posteriormente, la hibridación es llevada a cabo con polinucleótidos marcados que actúan como sonda e hibridan específicamente con el ADN de *Neospora*. La detección de los complejos de hibridación formados permite determinar la presencia o ausencia de ADN de *Neospora* en la muestra. De forma similar, la técnica de *Northern blot* puede ser usada para la detección de mRNA de *Neospora* en muestras de ARN.

Un método alternativo para la detección de ácidos nucleicos de *Neospora* es mediante ensayos de hibridación *in situ* (Angerer *et al.*, 1987, Methods. Enzymol. 152: 649-661). En este caso células o muestras tisulares permanecen fijadas a una superficie sólida y tras un proceso de desnaturalización de su ADN, la muestra es puesta en contacto con la sonda específica marcada. La sensibilidad de los ensayos de hibridación podría ser aumentada mediante la amplificación de la molécula de ácido nucleico diana con técnicas como la PCR.

La expresión de "hibridación específica" se refiere a la hibridación entre la secuencia que actúa como sonda con la secuencia diana únicamente. Aunque la sonda podría unirse a otras secuencias no relacionadas, al menos el 90% y preferiblemente el 95% o más de los complejos de hibridación formados serán con la secuencia diana.

Los ejemplos que siguen a continuación se exponen a efectos de proporcionar al experto en la materia una explicación suficientemente clara y completa de la presente invención, pero no deben ser considerados como limitaciones a los aspectos esenciales del objeto de la misma, tal y como han sido expuestos en los apartados anteriores de esta descripción.

Ejemplos

Ejemplo 1

Obtención de un nuevo aislado de *N. caninum* a partir de una ternera congénitamente infectada

En este ejemplo se describe el aislamiento del parásito *N. caninum* Nc-Spain 1H a partir de una ternera congénitamente infectada de la raza Frisona-Holstein.

La ternera nació de una vaca que había dado resultados positivos en las pruebas de detección para anticuerpos específicos frente a *Neospora* mantenida en una explotación lechera localizada en la provincia de Madrid, España. Desde el año 2001, la explotación fue sometida a diferentes estudios para confirmar la presencia y prevalencia de la infección por *Neospora*, estableciendo un patrón de infección endémico. En los fetos abortados procedentes de la explotación se detectó la presencia del ADN del parásito en el encéfalo mediante PCR anidada de la región ITS-1.

En Marzo del 2003, de una de las vacas identificada como seropositiva, nacieron dos terneros gemelos cuyo suero precolostral fue extraído y analizado para la detección de anticuerpos específicos frente a *Neospora* por la técnica de IFI (Pare *et al.*, 1995, J Vet Diagn Invest. 7(2):273-5), dando como resultado un título de 1:500. Dos semanas después de su nacimiento, ambos terneros permanecían saludables y sin mostrar ningún signo clínico. En esta fecha, uno de los terneros de sexo hembra fue sacrificado mediante una inyección de 20-40 ml de T-61 (Embutramida y Mebezonio yoduro, Intervet) por vía endovenosa e inmediatamente después, el encéfalo y la porción superior de la médula espinal fueron extraídos en condiciones asépticas y mantenidos a 4°C.

Se recogieron en condiciones asépticas diferentes porciones de 5 a 15 gramos de peso procedentes de ambos lóbulos y de la región anterior, media y posterior del encéfalo, así como de la médula espinal, y se mantuvieron a 4°C en una solución de tampón PBS con antibióticos (Penicilina G 2000 UI/ml, Estreptomycina 200 µg/ml) hasta su posterior inoculación a ratones de la estirpe Balb/c *nu/nu* atímicos.

ES 2 319 242 B1

En las muestras de encéfalo se procedió a la detección de la presencia de *N. caninum* en las mismas mediante PCR, antes de proceder al aislamiento del parásito.

Para ello se retiraron diferentes porciones de unos 20 mg de todas las secciones recogidas y se procedió a la extracción del ADN genómico, con el fin de llevar a cabo la detección de la presencia del ADN de *N. caninum* mediante la PCR anidada que amplifica la región ITS-1 del parásito (Buxton *et al.*, 1998, J.Comp Pathol. 118: 267-279).

Para la extracción del ADN se utilizó un kit comercial: "Genomic-Prep cell and tissue ADN isolation kit" (Amershan Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante y 5 µl de la solución del ADN resultante (100-200 ng) se utilizó como molde en la PCR anidada de la región ITS-1 descrita a continuación.

La amplificación de la región ITS-1 del ADN ribosomal de *N. caninum* se llevó a cabo en una primera reacción de PCR utilizando los oligos NN1 (5'- TCAACCTTTGAATCCCAA) y NN2 (5'- CGAGCCAAGACATCCATT), y en una segunda reacción empleando los oligos NP1 (5'- TACTACTCCCTGTGAGTTG) y NP2 (5'- TCTCTTCCCTCAACGCT). La mezcla de PCR (25 µl) se compone por 0,15 µM de cada oligo (Sigma), 200 µM dNTPs (Sigma), 1 x tampón (75 mM Tris pH 9, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl), (Biotools, España), 2 mM MgCl₂ (Biotools) y 0,625 unidades de ADN polimerasa (Biotools). En la primera reacción de amplificación se añade 5 µl de ADN y en la segunda, 2 µl del producto de la primera. Ambas reacciones se realizan en un termociclador según el siguiente programa: 94°C durante 5 min y 25 ciclos de 94°C/1 min, 48°C/1 min y 72°C/1,5 min y un último ciclo de 72°C durante 5 min. Los productos resultantes de la segunda amplificación con un tamaño 210 pb, se visualizan en un gel de agarosa al 1,6% en TBE (tampón Tris-borato-EDTA) 0,5 x teñido con bromuro de etidio.

La presencia del parásito fue detectada en la mayoría de las porciones de encéfalo analizadas.

Una vez confirmada la presencia del parásito en las muestras de encéfalo, las mismas se homogeneizaron con ciclos de 1 min de duración en un digestor automático Masticator IUL hasta su perfecta disgregación, se filtraron los macerados a través de una malla de 150 µm previamente esterilizada, y se centrifugaron durante 10 minutos a 1350 g. El sobrenadante se descartó y el precipitado equivalente a unos 5 gramos de tejido de partida se inoculó intraperitonealmente con jeringa de insulina y aguja de diámetro 0,5x16 mm a ratones de la estirpe Balb/c *nu/nu* hembras con un peso aproximado de 20-25 gramos. Todo el proceso se realizó en condiciones asépticas.

Los ratones inoculados se observaron diariamente para detectar la aparición de signos clínicos atribuibles a neoplasias que incluyen la pérdida de peso, desórdenes nerviosos, parálisis de extremidades y letargia, tal como se describe en Yamane *et al.*, 1998, J. Vet. Diagn. Invest. 10: 364-368. Estos signos clínicos se observaron en todos los ratones inoculados entre los 32-40 días post-inoculación (PI). Tras la aparición de estos síntomas, los ratones fueron sacrificados en atmósfera de CO₂ y utilizados para el aislamiento del parásito en cultivo celular, mediante la inoculación del lavado peritoneal.

Posteriormente, el encéfalo de los ratones eutanizados se retiró y se homogeneizó en solución de PBS con antibióticos-antimicóticos (Gibco, BRL, UK) por sucesivos pases de jeringa con agujas de 21 G y 25 G.

El homogeneizado equivalente a medio encéfalo se inoculó a un nuevo ratón de la estirpe Balb/c *nu/nu* que igualmente se monitorizó hasta la aparición de los signos clínicos descritos. El proceso se llevó a cabo hasta 7 pases consecutivos de ratón a ratón, observándose la aparición de los signos clínicos ya descritos en todos los ratones inoculados entre los 28 y 35 días PI. Con el fin de confirmar que los signos clínicos observados eran consecuencia de la infección por *N. caninum*, se procedió a la extracción del ADN a partir de 20 mg de muestra del encéfalo de los ratones que mostraron la sintomatología y fueron sometidas a la detección del producto de amplificación específico de la PCR anidada de la región ITS-1 de ADN del parásito como hemos descrito anteriormente.

En cuanto al aislamiento en cultivo celular se llevó a cabo mediante la inoculación del lavado peritoneal de los ratones sacrificados sobre un cultivo de células MARC-145 en monocapa.

Para ello se realizó el lavado de la cavidad peritoneal con aproximadamente 8 ml de medio Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) suplementado con suero fetal bovino al 2% y una solución de antibióticos-antimicóticos al 2% (100 UI/ml Penicilina G, 100 µg/ml Estreptomicina and 250 ng/ml Anfotericina B) (Gibco BRL, UK), que inmediatamente después, fue añadido sobre una monocapa de aproximadamente 10⁶ células de la línea MARC-145 en un frasco de cultivo de 25 cm².

A las 24 horas, se retiró el medio y se sustituyó por DMEM suplementado con suero equino al 2% y la misma solución de antibióticos-antimicóticos al 2%. Dependiendo del crecimiento celular, cada 4-7 días el cultivo se resuspendió con el uso de un "raspador" celular, se pasó por jeringa y aguja de 25 G y se añadió sobre un nuevo cultivo de 5x10⁵ células MARC-145. Nuevamente, a las 24 horas el medio se retiró y se sustituyó por DMEM suplementado con suero equino al 2%.

Los cultivos se mantuvieron en estufa húmeda a 37°C y atmósfera de CO₂ al 5% y se observaron diariamente en microscopio de contraste de fases para la visualización del parásito.

A los 24 días PI y tras cuatro pases consecutivos del cultivo se observaron taquizoítos en el cultivo celular que a continuación fue mantenido por pases sucesivos según el procedimiento descrito hasta obtener recuentos en cámara de Neubauer igual o superior a 10^6 taquizoítos.

A partir de este momento, el cultivo se mantuvo según describe Perez-Zaballos *et al.*, 2005, J. Parasitol., 91(3): 507-10.

Ejemplo 2

Caracterización genética del aislado Nc-Spain 1H. Identificación de secuencias microsatélites

En este ejemplo se describe la identificación y caracterización genética del aislado Nc-Spain 1H, junto con otros aislados obtenidos a partir de diversos hospedadores y de diferente origen geográfico, permitiendo su identificación y discriminación del resto de aislados. Para ello se amplificaron y secuenciaron 13 secuencias microsatélites identificadas en el genoma de *N. caninum* a partir de 10 aislados distintos, incluido el que es objeto de la presente invención.

Para la identificación de secuencias microsatélites en el genoma de *N. caninum*, aproximadamente 25.330 ESTs (*Expression Sequences Tags*) depositadas en bancos de datos públicos derivadas de los aislados de *N. caninum* Nc-1 y Nc-Liv fueron analizadas con los programas informáticos *Tandem Repeat Occurrence Locator* (TROLL) (Castelo *et al.*, 2002, Bioinformatics. 18:634-636) y *Tandem Repeats Finder* (TRF) (Benson 1999, Nucleic Acids Res. 27:573-580) que permitieron la identificación de 181 secuencias micro- y minisatélites. Para evitar el análisis de secuencias redundantes e identificar posibles secuencias homologas en otros organismos, las 181 secuencias fueron analizadas utilizando el programa informático BLASTN confirmando la presencia de 40 secuencias redundantes. Así, fueron encontradas 126 secuencias que contenían microsatélites resultantes de la repetición en tándem del motivo (TA)_n, 2 del (AGA)_n, y 1 para los motivos (TC)_n, (GT)_n, (GA)_n, (TTC)_n, (CCT)_n, (AAG)_n, (TACA)_n y (ATCT)_n.

De las 126 secuencias originales, se seleccionaron 13 marcadores microsatélites en función de varios criterios que incluían la posibilidad de diseño de cebadores para su posterior amplificación por PCR y secuenciación, el número de repeticiones en tándem que presentaban, seleccionando los de mayor número, y su localización, fuera de regiones codificantes del genoma, con la finalidad de seleccionar los más polimórficos. En la Tabla I se describen los microsatélites utilizados en este estudio como marcadores moleculares. Para cada microsatélite seleccionado, que se denominaron como se especifica en la Tabla I, se diseñaron cebadores específicos (Genotek, Bonsay Technologies, España) para la amplificación de productos de PCR de aproximadamente 300 pb, que incluían el motivo de repetición y parte de las secuencias que lo flanquean. Posteriormente, estos cebadores fueron aplicados para la amplificación y secuenciación de los microsatélites seleccionados a partir del ADN genómico de diez aislados de *N. caninum* de diferentes hospedadores y origen geográfico, incluido el aislado objeto de la invención, tal como se muestra en la Tabla II.

Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en volúmenes de 50 μ l compuestos de 0.2 μ M de cada cebador, 200 μ M dNTPs (Sigma), 1x tampón (75 mM Tris pH 9, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 50 mM KCl,) (Biotools, España), 2 mM MgCl₂ (Bio-tools), 2 unidades de ADN polimerasa (Biotools) y 50 ng de ADN molde. Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 1 ciclo a 94°C durante 5 min, 35 ciclos de 94°C/1 min, 60°C/1 min, y 72°C/1 min, con un ciclo final de 72°C durante 10 min. En cada serie de amplificaciones como control negativo ADN obtenido a partir de las células donde el parásito era habitualmente mantenido y H₂O fueron incluidas. Los productos de PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa-bromuro de etidio (NuSieve 3:1, Cambrex BioScience, USA) al 2.5% y visualizados bajo luz UV. Posteriormente, los productos fueron purificados con el Exo-SAP IT kit (USB, USA), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y directamente secuenciados en ambas direcciones. Las secuencias fueron analizadas usando el programa informático BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0.1 (Copyright© 1997-2004 Tom Hall, Ibis Therapeutics, Carlsbad CA 92008, USA) y depositadas en el banco de datos GenBank database bajo los números de acceso AY935165-AY935200 y AY937107-AY937178, excepto para el aislado Nc-Spain 1H, que se recogen en la Figura 1.

TABLA I: Descripción de los microsátélites utilizados en este estudio como marcadores.

Marcador.	Nº Acceso	Fuente ^a	Motivo de repetición ^b	Cebadores PCR (5'-3')		Nº de Alelos
				Directo	Inverso	
MS1A	CF260074	Nc-Liv	(TA) ₆₀	ACGACGCCCTTTCAACTGTC	CGTCCGTTCTCCTCTCTCAG	3
MS1B	CF941843	Nc-1				
	CF260074	Nc-Liv	(AT) ₁₂	GGAGAACGGACGACGTTAAG	CCCACAAACTCCCTTTTCCTC	3
MS2	CF941871	Nc-1				
	CF261297	Nc-Liv	(AT) ₂₃	CTCTTCTCACCAGCCCAAGTC	GCTGTTACAAACCCACGGAAC	4
MS3	CD667923	Nc-1				
	CF423151	Nc-Liv	(AT) ₁₄	GACTTTGTTTGCCACTGTGCG	TCCGACATCTACGGACATCG	4
MS4	CF967777	Nc-1				
	CF937799	Nc-Liv	(AT) ₁₈	AGAAGAAGAAACGCGGAATG	TCTGAAACGAATTCCCTTGG	6
MS5	CF942627	Nc-1				
	CF598243	Nc-Liv	(TA) ₁₁	AATCAGGACTCCGTACACACC	CCAGAGAGTCCCACATCTC	7
MS6A	CD667615	Nc-1				
	CF942647	Nc-1	(TA) ₁₂	TCCGCGTGTGGTTTATCT	TGCGCATGCACGAATAATAG	5
MS6B	CF261131	Nc-Liv	(AT) ₁₂	GCACTCATGGGATTTTGTAGG	AAAATCAATGCACCTGATCG	4
	CF942647	Nc-1				
MS7	CF371133	Nc-Liv	(TA) ₁₅	GATCCAACCTCGGCGAGATAC	CGTTCCCTTCCCAAATCTTC	5
	CD680118	Nc-1				
MS8	CF938766	Nc-Liv	(AT) ₁₇	ACACTCGCCTTTCCCTTTGTG	CACACAGGCCAGTTGAAAAG	6
	CF421954	Nc-1				
MS10	CF659321	Nc-1	(ACT) ₇ -(AGA) ₁₂ -(TGA) ₉	CTATCACAGCCGTGAGTGTTG	CGCGCTATCCTTTTATCT	9
MS12	CF937360	Nc-Liv	(GT) ₁₆	CCAGCATTTCTTCTCCTT	CAAAAACGCACCTTCTTTTCG	3
MS21	BF824453	Nc-1	(TACA) ₁₀	TGTGAGCATAACGGTGGTTC	TTTCTACCCCTCCCTTCACC	2

^a ESTs de genótipos de ADN complementario de taquizoitos.

^b Motivo de repetición identificado en las ESTs del aislado Nc-Liv y, excepcionalmente del aislado Nc-1 cuando únicamente esta estaba disponible.

TABLA II: Aislados de *N. caninum* incluidos en este estudio y los alelos obtenidos para los distintos microsatélites analizados.

Aislado	Hospeda- dor	Origen Geográfi- co	Referencia	Alelos y análisis en multilocus de los microsatélites estudiados												
				MS1A	MS1B	MS2	MS3	MS4	MS5	MS6A	MS6B	MS7	MS8	MS10	MS12	MS21
Nc-Liv	Canino	UK	Barber <i>et al.</i> , 1995, Parasitol. 111 (Pt 5):563-568.	1	1	3	4	6	1	4	2	4	5	9	2	1
Nc-SweB1	Bovino	Suecia	Stenlund <i>et al.</i> , 1997, Parasitol. Res. 83:214-219	1	1	4	1	4	5	1	4	3	2	2	2	1
Nc-Bahia	Canino	Brasil	Gondim <i>et al.</i> , 2001, Vet.Parasitol. 101:1- 7	1	2	2	3	4	5	4	2	1	2	1	2	1
Nc-PV1	Bovino	Italia	Magnino <i>et al.</i> , 1999 Vet.Rec. 144:456	1	1	3	2	5	3	5	2	4	4	4	2	1
Hammondi a heydoni- Berlin-1996	Canino	Alemania	Müller <i>et al.</i> , 2001, Parasitol. Res. 87:883-885	2	1	2	2	2	2	2	1	1	6	3	3	1
Nc-GER1	Canino	Alemania	Peters <i>et al.</i> , 2000, Parasitol. Res. 86:1- 7	1	3	3	2	3	4	3	2	3	2	8	3	1
KBA1	Bovino	Corea	Kim <i>et al.</i> , 2000, Vet.Parasitol. 90:147-154	1	1	2	1	6	6	3	2	2	3	5	2	1
KBA2	Bovino	Corea	Kim <i>et al.</i> , 2000, Vet.Parasitol. 90:147-154	3	1	2	1	6	7	3	2	2	3	6	2	1
Nc-SHEEP	Ovino	Japón	Koyama <i>et al.</i> , 2001, J.Parasitol. 87:1486- 1488	1	1	1	2	1	1	4	3	2	1	7	1	1
NC-SPAIN 1H	BOVINO	ESPAÑA		1	1	3	2	4	1	6	2	3	4	6	2	1

Uno de los microsatélites fue monomórfico en los 10 aislados analizados (MS21). La presencia de polimorfismo para los 13 microsatélites seleccionados variaba desde un bajo polimorfismo con 3 alelos para cada microsatélite (MS1A, MS1B, MS12 y MS21) hasta 4 a 9 alelos para el resto de microsatélites. Además, el MS7 mostró un alelo que portaba un SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

Para el análisis de los genotipos de cada aislado en “multilocus”, cada alelo fue designado con un número de acuerdo a la longitud del motivo repetitivo y las diferencias encontradas en su secuencia. El análisis en “multilocus” aumentó considerablemente el poder discriminatorio de las secuencias microsatélites y así, fueron obtenidos perfiles genéticos únicos para cada aislado, indicando que todos los aislados difirieron significativamente entre ellos, como se puede observar en la Tabla II.

Ejemplo 3

Patogenicidad del aislado Nc-Spain 1H en un modelo murino

En este apartado se describen los experimentos llevados a cabo para investigar la patogenicidad del aislado Nc-Spain 1H en un modelo murino experimental.

Para ello, se inocularon ratones hembras BALB/c de 6 semanas de edad por vía intraperitoneal con 10^5 (grupo A), 10^6 (grupo B) y 10^7 (grupo C) taquizoítos del aislado Nc-Spain 1H obtenidos del cultivo celular preparado en el Ejemplo 1. El grupo control (grupo D) consistió en ratones BALB/c inoculados con 200 μ l de PBS por vía intraperitoneal.

En el curso del experimento se sacrificaron aleatoriamente en los días 1, 2, 4, 8, 16 y 32, tres animales de cada grupo, con la excepción de los días 1, 2 y 4 en el grupo C que se sacrificaron cuatro ratones por día.

Los animales se alojaron en jaulas de plástico, en grupos de 5 animales por jaula, se mantuvieron a una temperatura ambiente de 20-24°C sometidos a un foto- periodo de 12 horas de luz y 12 de oscuridad. El pienso y el agua se suministraron *ad libitum*.

Todos los ratones fueron examinados diariamente para observar síntomas compatibles con la infección por *N. caninum* en el ratón (Lindsay & Dubey, 1989, J. Parasitol. 75:772-779; Lindsay & Dubey, 1990, J. Parasitol. 76:410-413; Lindsay *et al.*, 1995, J. Parasitol. 81:313-315).

El sacrificio de los ratones se realizó en campana de CO₂. Inmediatamente después del sacrificio se obtuvo sangre mediante punción intracardíaca con jeringa de insulina y aguja de diámetro 0,5x16 mm. Los ratones fueron pesados en el momento del sacrificio con el fin de detectar una disminución significativa del peso con respecto al grupo control. Las muestras de sangre (200-500 μ l) se depositaron en tubos de 1,5 ml con EDTA para el estudio de la parasitemia. Posteriormente, se realizó la necropsia de cada individuo procediendo a la apertura de las cavidades abdominal y torácica, valorándose la presencia de lesiones macroscópicas y extrayéndose el pulmón y el encéfalo, los cuales se congelaron a -80°C en un tubo de 1,5 ml estéril hasta la extracción del ADN con el objetivo de detectar la presencia del parásito por PCR.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 2000 g durante 10 min, recogiendo el sobrenadante (plasma) que se conservó a -80°C hasta el estudio de la respuesta inmune humoral inducida por el parásito utilizando la técnica de IFI y ELISA.

El sedimento formado por las células sanguíneas, obtenido tras centrifugar las muestras de sangre y retirar el plasma, se destinó a la extracción del ADN utilizando el sistema comercial: “Genomic-Prep cell and blood DNA isolation kit” (Amershan Biosciences), que incluye los reactivos necesarios y las instrucciones para su ejecución.

Las muestras de ADN se conservaron a -20°C hasta su posterior análisis por PCR.

La extracción del ADN de pulmón y encéfalo se realizó a partir de 10-20 mg de tejido fresco congelado, disgregado con bisturí, utilizando como método de extracción el sistema comercial: “Genomic-Prep cell and tissue DNA isolation kit” (Amershan Biosciences), que incluye los reactivos necesarios y las instrucciones para su ejecución.

Para la detección del parásito en las muestras de sangre, pulmón y encéfalo recogidas de los animales sacrificados se utilizó la técnica de PCR anidada de la región ITS-1, siguiendo el procedimiento descrito en el Ejemplo 1. En todas las reacciones se utilizaron como testigo positivo el ADN obtenido de taquizoítos de *N. caninum* y como negativo agua ultrapura estéril.

Los ratones de los grupos infectados (grupos A, B y C) no desarrollaron signos compatibles con la infección ni mortalidad, durante la duración del experimento. Durante la necropsia se observó esplenomegalia y linfadenopatía en ganglios mesentéricos e ilíacos en la mayoría de los ratones infectados con el parásito desde el día 2 al día 16 PI.

El ADN de *N. caninum* se detectó en sangre desde el día 1 al 5 PI (post-inoculación) y en pulmón y encéfalo desde el día 1 al 16 PI. En lo que se refiere a la frecuencia de detección de *N. caninum* se observó una mayor detectabilidad

ES 2 319 242 B1

del parásito al aumentar la dosis del inóculo. En el Grupo D (grupo testigo) todas las muestras analizadas fueron negativas, según lo esperado.

Los resultados obtenidos para la distribución del parásito en los Grupos A, B y C se muestran en la Tabla III.

TABLA III

Días PI	Sangre			Pulmón			Encéfalo		
	10 ⁵ ^a	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
1	1/3 ^b	3/3	4/4	1/3	0/3	2/4	0/3	0/3	2/4
2	1/3	1/3	4/4	1/3	3/3	3/4	1/3	2/4	1/4
4	1/3	1/3	4/4	0/3	2/3	3/4	0/3	0/3	2/4
8	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	3/3	1/3	0/3	1/3
16	0/3	0/3	0/3	0/3	1/3	1/3	0/3	1/3	0/3
32	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

^a Dosis de taquizoítos utilizadas en las inoculaciones.

^b Las fracciones representan número de ratones positivos por PCR / número de ratones analizados.

En dicha tabla se puede observar que a los 8 días post-inoculación el parásito ha desaparecido de la sangre de los ratones, incluso de aquellos que fueron inoculados con la dosis más alta, y a los 16 días post-inoculación ha desaparecido de los pulmones y del encéfalo de la mayoría de los ratones inoculados, incluso de aquellos inoculados con las dosis más altas. Ello indica un alto grado de atenuación de la cepa Nc-Spain 1H, objeto de esta patente.

Ejemplo 4

Patogenicidad del aislado Nc-Spain 1H en un modelo bovino gestante

En este ejemplo se describen los estudios llevados a cabo para estudiar la patogenicidad del aislado Nc-Spain 1H en un modelo bovino gestante.

En este experimento se inocularon 13 novillas en el día 70 de gestación administrando por vía endovenosa 10⁷ taquizoítos del aislado Nc-1 (grupo 1), Nc-Spain 1H (grupo 2) o PBS (grupo 3). Cada grupo se compuso de cinco animales, con la excepción del grupo 3 que fueron tres. Las 13 novillas gestantes fueron menores de 24 meses de edad, seronegativas frente a *N. caninum*, *Leptospira spp.* y *Brucella abortus* y vacunadas frente a VIBR, VBVD, VPI 3 y VBRS.

Para las inoculaciones, los taquizoítos de los aislados Nc-1 y Nc-Spain 1H se obtuvieron mediante replicación en cultivo celular según se describe en el Ejemplo 1.

Para el seguimiento de la gestación, se realizó una ecografía transrectal una vez a la semana, tras la inoculación, con fin de determinar la viabilidad del feto, procediéndose al sacrificio de aquellos animales en los que se detectó por ecografía la muerte fetal. En el día 45 post-inoculación (PI) todas las restantes novillas fueron sacrificadas.

In vivo, se recogió sangre entera de la vena coccígea en tubos con EDTA para el estudio de la parasitemia. La extracción de ADN, a partir de sangre y tejidos de novillas y fetos se realizó utilizando una prueba comercial (REAL-PURE, Durviz). Una vez extraído el ADN, se midió la concentración de cada muestra mediante espectrofotometría ajustándose la concentración a 60 ng/μl en agua ultrapura estéril.

ES 2 319 242 B1

El estudio histológico de las muestras tomadas en el *post-mortem* se basó en la observación de las lesiones características de la infección por *N. caninum* en la especie bovina. Las lesiones en encéfalo, corazón, hígado, y placenta se graduaron según la extensión e intensidad de la lesión que presentaban en ausentes (0), leves (1), moderadas (2) o graves (3).

Los signos clínicos observados durante el experimento fueron diarrea, fiebre y muerte fetal. La diarrea se observó en los días 6 (animal 1776) y 7 PI (animales 8862 y 1776), probablemente debida a la llegada de un nuevo lote de pienso.

Al comparar la temperatura entre los diferentes grupos no se observó un incremento anormal de la temperatura en ninguno de los días ($P>0,05$; Análisis de varianza unifactorial).

La muerte fetal se diagnosticó por ecografía en 3 de los 5 animales pertenecientes al grupo 1. Los animales y días en los que se diagnosticó la muerte fetal fueron los siguientes: 7848 en el día 26 PI, 1785 y 1767 en el día 34 PI. En el día 35 PI, se observó la presencia de moco de color ambarino en vulva y cérvix abierto en el animal 1785. El resto de los animales del grupo 1 y todos los animales de los grupos 2 y 3 presentaron una imagen ecográfica normal con movimiento fetal.

En cuanto a la parasitemia, en todos los animales del grupo 1 se detectó la presencia del ADN del parásito en algún momento del estudio, mientras que en el grupo 2, tres de los cinco animales que lo forman presentaron parasitemia. En el grupo 3, ningún animal resultó positivo durante el estudio según lo esperado.

En la Tabla IV se muestra la detección de la presencia de ADN de *N. caninum* en la sangre de los animales infectados con el aislado Nc-1 (grupo 1) y Nc-Spain 1H (grupo 2).

TABLA IV

Día PI	Grupo 1 (Nc-1)					Grupo 2 (Nc-Spain1H)				
	1767	1785	1587	1786	7848	1711	1638	1563	1782	1965
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
5	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
24	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-

Durante el examen externo y necropsia de aquellos animales en los que se diagnosticó la muerte fetal (7848, 1767 y 1785) se observó una hipertrofia ganglionar generalizada, además de tonsilas reactivas con marcada activación de la pulpa blanca esplénica e hiperplasia de folículos linfoides. En el animal 7848, el pulmón presentó una cantidad variable de espuma en la tráquea (edema pulmonar) y en el abomaso e intestino delgado se observó un edema de la mucosa, más evidente en los pliegues de la zona antral en el caso del abomaso, acompañado de un aumento de moco en el lumen (abomasitis catarral). En el resto de las novillas, los pulmones no se colapsaron al desaparecer la presión negativa.

A la apertura de la placenta en los tres animales sacrificados, se observó un contenido turbio de aspecto hemorrágico. Los placentomas estaban separados pudiendo observarse las carúnculas hemorrágicas, siendo más intensas en el animal 7848. El resto de novillas sacrificadas en el día 45 PI no presentaron alteraciones macroscópicas reseñables, con líquido amniótico y placentomas de aspecto normal.

En cuanto a los resultados del examen histológico en el sistema nervioso central de las novillas, la mayoría de las mismas no mostraron signos de inflamación a excepción de una marcada congestión vascular. Sólo en el grupo de animales que tuvieron muerte fetal (animales 7848, 1767 y 1785) se observó la presencia de algunos manguitos perivasculares. En la placenta, histológicamente se pueden diferenciar dos grupos. Por un lado las lesiones observadas en el grupo de animales que tuvieron muerte fetal en los que el placentoma presentó una extensa hemorragia en la parte superior de la carúncula, así como múltiples focos de necrosis en la placenta materna. La mayoría de las vellosidades fetales aparecieron necróticas con una fuerte descamación del epitelio que las recubre.

En relación con la intensidad de las lesiones en las novillas las más graves se observaron en placenta y en los animales que presentaron muerte fetal.

En la Tabla V se muestra la intensidad de las lesiones observadas en las novillas en el sistema nervioso central (SNC) y en placenta.

En relación con el examen macroscópico de los fetos, sólo se observaron alteraciones macroscópicas en los tres fetos que murieron antes del día 45 PI. Los fetos presentaban un aspecto ligeramente autolítico caracterizado por un edema generalizado, así como un marcado hemoperitoneo, hemotórax y hemopericardias. El resto de los fetos de las novillas sacrificadas en el día 45 PI no presentaron alteraciones macroscópicas reseñables.

TABLA V

Referencia animal	SNC	Placenta
8862	0	0
1776	0	0
1560	0	0
1767	1	3
1785	0	3
1587	1	0
1786	0	2
7848	1	3
1711	0	0
1638	0	1
1563	0	0
1782	0	0
1965	0	0

ES 2 319 242 B1

En el estudio histológico de los órganos fetales, en el hígado de todos los fetos se observó una intensa actividad hematopoyética y en algunos de ellos acúmulos focales de células redondas intraparenquimatosos (linfocitos e histiocitos) que forman pequeños granulomas y marcada congestión sinusal. En los fetos correspondientes a los animales 7848, 1767 y 1785 se observaron múltiples focos de necrosis intraparenquimatosos (hepatitis necrotizante).

En el corazón, los fetos abortados mostraron una miocarditis linfocítica, mientras que en el resto de los animales se apreciaba una ligera infiltración difusa de células redondas y presencia de manguitos perivascuales. En el SNC, las lesiones más destacables fueron la presencia de microhemorragias, focos de manguitos linfocíticos perivascuales y nódulos gliales.

En relación con la intensidad de las lesiones las más graves se observaron en SNC y en los animales que presentaron muerte fetal. Asimismo, se realizó una segunda valoración de las lesiones histológicas en los grupos infectados.

En la Tabla VI se muestra la intensidad de las lesiones observadas en los fetos en hígado, corazón y sistema nervioso central.

TABLA VI

Referencia animal	Hígado	Corazón	SNC
8862	0	0	0
1776	0	0	0
1560	0	0	0
1767	2/3 ^a	2/2	1/1
1785	1/1	2/1	2/2
1587	1/1	1/1	2/1
1786	1/0	1/1	3/2
7848	3/2	2/2	2/2
1711	0/0	1/1	1/1
1638	0/0	1/0	2/1
1563	0/0	1/1	1/1
1782	0/1	2/1	1/1
1965	0/0	1/0	2/0

^a Resultado de la segunda valoración de las lesiones histológicas

La presencia del ADN del parásito no se detectó en ninguna de las muestras de encéfalo de las diferentes novillas analizadas, sin embargo cuando se estudiaron las placentas, aquellas procedentes de los animales abortados fueron positivas y también la de la novilla 1638 (grupo Nc-Spain1H). Asimismo, la presencia del parásito se detectó en el encéfalo, corazón e hígado de los fetos abortados (fetos 7848, 1767 y 1767). En el resto de los fetos los resultados fueron negativos.

Ejemplo 5

Inmunogenicidad del aislado Nc-Spain 1H en un modelo murino

5 La detección de anticuerpos específicos frente a *N. caninum* en el plasma de los ratones infectados del Ejemplo 3 se determinó mediante las técnicas de IFI y ELISA.

10 Para la técnica de IFI (Trees *et al.*, 1993. Vet.Rec. 132:125-126), inicialmente, se depositaron 8 μ l de una suspensión de 10^7 taquizoítos formalinizados/ml del aislado de referencia Nc-1 (Dubey *et al.*, 1988, J. Am. Vet. Med. Assoc. 193:1259-63), en cada pocillo de un portaobjetos de inmunofluorescencia (Cultek) de 18 pocillos de 4 mm de diámetro. Posteriormente, la preparación se dejó secar al aire, fijándose a continuación con acetona durante 10 min a -20°C. Tras la fijación, se añadió el suero procedente de los ratones infectados (10 μ l/pocillo), y se incubó 30 min a 37°C en una cámara húmeda.

15 Las diluciones de los sueros de los ratones se realizaron en PBS comenzando por una dilución 1:25 y realizándose diluciones seriadas hasta conseguir la última dilución en la cual los sueros dejaron de ser positivos. Como testigo negativo de la reacción se utilizaron los sueros de los ratones inoculados con PBS y como blanco de la reacción se utilizó PBS. Posteriormente, los portaobjetos se lavaron dos veces con PBS (10 min cada vez) y se añadió la inmunoglobulina IgG de ratón unida al fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (Sigma, referencia F-0257) a una dilución 1:128 en una solución PBS-azul de Evans (1:10000), incubándose a 37°C durante media hora en una cámara húmeda. A continuación, los pocillos se lavaron de nuevo con PBS (3 veces durante 10 min cada vez) realizándose un último lavado de 10 min con agua destilada, tras el cual, los pocillos se secaron al aire y se procedió al montaje del portaobjetos con Fluoprep (Biomerieux) y un cubreobjetos de 24 x 60 mm. Los pocillos fueron examinados con un microscopio de fluorescencia a x 400 (Nikon, Lámpara de mercurio modelo HB-10101AF).

25 La presencia de anticuerpos se detectó a partir del día 8 PI en los grupos inoculados con la dosis mayor (grupo C), como se muestra en la Tabla VII.

TABLA VII

Días PI	DOSIS		
	10^5	10^6	10^7
1	0/3 ^a	0/3	0/4
2	0/3	0/3	0/4
4	0/3	0/3	0/4
8	0/3	0/3	3/3
16	0/3	3/3	3/3
32	1/3	1/3	3/3

^a Las fracciones representan número de ratones positivos por IFI/número de ratones analizados.

Los títulos obtenidos por IFI variaron también en función de la dosis infectiva, obteniéndose los más elevados (1:200-1:400) en los ratones del grupo C, como se muestra en la Figura 2.

La detección de las inmunoglobulinas de los isotipos IgG1 e IgG2a específicas para *N. caninum* en el plasma se llevó a cabo mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto siguiendo procedimientos convencionales. Los resultados se expresaron como densidad óptica. Como testigos de la prueba se incluyeron en cada placa una muestra de suero de ratón negativa (densidad óptica menor de 0,1) así como un suero de ratón infectado experimentalmente con una densidad óptica mayor de 2,0.

En relación con los isotipos IgG2a e IgG1, se observó un aumento de los mismos a partir del día 8 PI, siendo más evidente el incremento de la inmunoglobulina IgG2a y en los grupos B y C. En los días 16 y 32 PI, los ratones inoculados con 10^5 y 10^6 taquizoítos tuvieron mayor concentración de IgG2a que IgG1. No obstante, en el grupo inoculado con 10^7 taquizoítos la producción de IgG1 fue predominante en el día 16 (Figuras 3A, 3B y 3C).

Ejemplo 6

Inmunogenicidad del aislado Nc-Spain 1H en un modelo bovino gestante

En este ensayo se utilizaron 13 novillas menores de 24 meses de edad que eran seronegativas frente a *N. caninum*, IBRV, BVDv, *Leptospira spp.* y *Brucella abortus*.

En el día 70 de gestación se administraron por vía intravenosa 10^7 taquizoítos del aislado Nc-1 (grupo 1) a 5 animales, 10^7 taquizoítos del aislado Nc-Spain 1H (grupo 2) a otros 5 animales, o PBS (grupo 3, grupo testigo) a otros tres animales.

Se recogió sangre entera de la vena coccígea en tubos heparinizados para el estudio de producción de IFN- γ y en tubos sin anticoagulante para la obtención de suero que se utilizó en el estudio de la respuesta inmune humoral (IgG, IgG1 e IgG2) frente a *N. caninum* por ELISA. Las muestras se recogieron los días -2 y 0 y posteriormente 2 veces a la semana desde el día 3 hasta el día 41 post-inoculación (PI).

Para la determinación de producción de IFN- γ por linfocitos periféricos sensibilizados, las muestras de sangre se conservaron a temperatura ambiente y se inició el proceso de cultivo inmediatamente después de su obtención. Todo el proceso se realizó en una cabina de flujo laminar utilizándose puntas de micropipeta con filtro.

La sangre en los tubos heparinizados se homogenizó 10 veces, y se añadieron 900 μ l de sangre entera a cada pocillo de una placa de cultivo con fondo plano (3 pocillos por animal). Un pocillo se estimuló con Concanavalina A (100 μ l, concentración final 10 μ g/ml, Sigma), un segundo con antígeno soluble de Nc-1 (100 μ l, concentración final 1 μ g/ml) y el tercero con PBS estéril (100 μ l, 0,01M, pH 7,2). Posteriormente, se homogenizaron las placas unas 20 veces y se incubaron en estufa a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂. A las 20-24 h las placas se centrifugaron a 500 g, 10 min a temperatura ambiente y de cada pocillo se recogieron 200-400 μ l del sobrenadante que se guardaron en tubos de 1,5 ml a -20°C hasta el posterior análisis. La determinación de IFN- γ se llevó a cabo a partir de los sobrenadantes utilizando un ensayo ELISA comercial (Bovigam, CSL, Ingenasa) según las indicaciones del fabricante. Los resultados se expresaron como valores de densidad óptica (OD) a 450 nm.

En los grupos infectados se detectó un incremento en los niveles IFN- γ frente a los del grupo testigo (grupo 3) en el día 5 PI ($P < 0,05$; Duncan). En el grupo infectado con Nc-1 (grupo 1) se observaron niveles altos de IFN- γ a lo largo de todo el estudio, alcanzándose los máximos en el día 24 PI. En el grupo infectado con Nc-Spain 1H (grupo 2), los valores más altos se observaron en los días 5 y 12 PI, momento a partir del cual se observó un descenso en los niveles de IFN- γ , encontrándose sólo diferencias significativas con respecto al grupo testigo en los días 19 y 34 PI ($P < 0,05$; Duncan).

Al comparar los dos grupos infectados los valores obtenidos en el grupo 1 fueron significativamente superiores a los del grupo 2 en los días 10, 12, 17, 19, 24, 31, 34, 39 y 41 PI ($P < 0,05$; Duncan) como se puede observar en la Figura 4.

La caracterización de la respuesta inmune humoral (IgG total, IgG1 e IgG2a) se llevó a cabo utilizando un ensayo ELISA indirecto con proteínas solubles de *N. caninum* como antígeno.

Las muestras de suero se diluyeron a 1:100. Como testigo positivo se empleó el suero de una reproductora con abortos asociados a la infección por *N. caninum* con resultado de serología positivo por WB e IFI (título 1:1600-3200). Como testigo negativo se utilizó el suero de una reproductora procedente de una explotación sin antecedentes de fallo reproductivo y con resultado de serología negativo por WB e IFI.

Para la determinación de la IgG total, se utilizó un anticuerpo monoclonal mAb anti bovino IgG1 y IgG2 (Laboratoire Service International, Francia) a una dilución de 1:2000 en PBS-Tween 0,05%. Los conjugados para la valoración de IgG1 e IgG2 (Serotec) se usaron a una dilución 1:100000 y 1:40000, respectivamente. Los resultados se expresaron como valores de densidad óptica a 450 nm (OD).

ES 2 319 242 B1

Al analizar los resultados obtenidos para IgG total específica, en el grupo 1 (Nc-1) se observó un aumento significativo de los valores de OD respecto al grupo testigo en el día 10 PI, pero sobre todo a partir del día 17 PI ($P<0,05$; Duncan), obteniéndose los valores más elevados en los días 24 y 26 PI. En el grupo 2 (Nc-Spain1H), se observó un incremento también a partir del día 17 PI con el máximo valor en el día 19 PI.

Sin embargo, a pesar de que los valores del grupo 2 fueron superiores a los del grupo testigo no se obtuvieron diferencias significativas ($P>0,05$; Duncan). Al comparar los dos grupos infectados, los valores obtenidos en el grupo 1 fueron significativamente superiores a los del grupo 2 en los días 17, 24, 26, 31, 34, 39 y 41 PI ($P<0,05$; Duncan).

En la Figura 5 se presentan los valores de OD para los tres grupos.

Los isotipos IgG1 e IgG2 se valoraron a partir del día en el que se observó un aumento significativo de los valores de OD de IgG respecto al grupo testigo (día 10 PI). Los niveles de IgG1 permanecieron al mismo nivel que el grupo testigo durante los primeros días PI analizados. En ambos grupos, se detectó un aumento significativo versus el grupo testigo en el día 12 PI ($P<0,05$; Duncan) y los mayores niveles se alcanzaron a partir del día 34 PI. Respecto a los valores de IgG2, en el grupo 1 se detectó un aumento significativo frente al grupo testigo en el día 17 PI ($P<0,05$; Duncan), alcanzando los máximos niveles en los días 34 y 39 PI. En el grupo 2, los valores de IgG2 permanecieron ligeramente por encima de los del grupo testigo, no encontrándose, sin embargo, diferencias significativas entre ambos ($P>0,05$; Duncan).

En los dos grupos infectados, la concentración de IgG1 fue mayor que la de IgG2 durante todo el experimento. Al comparar los dos grupos infectados, los valores de ambos isotipos fueron más altos en el grupo 1 que en el 2 a partir del día 17 PI ($P<0,05$, Duncan). Los animales testigos permanecieron seronegativos a *N. caninum* durante todo el experimento.

En las Figuras 6A y 6B se representan los valores medios de IgG1 e IgG2 anti-*N. caninum* en los animales inoculados con el aislado Nc-1, Nc-Spain 1H, y PBS.

Se puede observar en dichas figuras la producción de anticuerpos contra proteínas de *N. caninum* en los animales infectados con el aislado de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Parásito aislado depositado en la Colección de Cultivos de Algas y Protozoos (Culture Collection of Algae and Protozoa, CCAP) con el número de acceso CCAP 2051/2.

2. Cultivo celular biológicamente puro infectado por el aislado de reivindicación 1.

3. Cultivo celular de la reivindicación 2 **caracterizado** porque es de células de riñón de mono.

4. Anticuerpo que reacciona específicamente contra un antígeno procedente del aislado de la reivindicación 1.

5. Anticuerpo según la reivindicación 4, **caracterizado** porque el antígeno se selecciona entre el grupo formado por el propio aislado, taquizoítos, bradizoítos, esporozoítos, lisados celulares, polipéptidos antigénicos, y sus mezclas.

6. Anticuerpo según la reivindicación 5 **caracterizado** porque el antígeno se selecciona entre el grupo formado por taquizoítos y polipéptidos antigénicos.

7. Anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 **caracterizado** porque es monoclonal.

8. Polipéptido obtenido a partir del aislado de la reivindicación 1.

9. Polinucleótido obtenido a partir del aislado de la reivindicación 1.

10. Vacuna que comprende el aislado de la reivindicación 1, un extracto del mismo, o una mezcla de ambos.

11. Vacuna según la reivindicación 10 **caracterizada** porque el aislado está en forma de aislado vivo atenuado, inactivado, o fijado, en cualquier estadio de su ciclo biológico.

12. Vacuna según la reivindicación 10 **caracterizada** porque el extracto se selecciona entre el grupo formado por lisados celulares, polipéptidos antigénicos y polinucleótidos que codifican polipéptidos antigénicos.

13. Uso del aislado de la reivindicación 1 para preparar una vacuna para el tratamiento y/o prevención de la neosporosis en animales.

14. Uso de anticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 para preparar un medicamento para el tratamiento de una infección y/o enfermedad causada por *Neospora caninum* en animales.

15. Uso de antígenos procedentes del aislado de la reivindicación 1 para detectar la infección por el parásito *Neospora caninum* en animales, a partir de una muestra biológica.

16. Uso según la reivindicación 15 **caracterizado** porque el antígeno se selecciona entre el grupo formado por el propio aislado, taquizoítos, bradizoítos, esporozoítos, lisados celulares, polipéptidos antigénicos, y sus mezclas.

17. Uso según la reivindicación 16 **caracterizado** porque el antígeno se selecciona entre el grupo formado por taquizoítos y polipéptidos antigénicos.

18. Uso de anticuerpos de las reivindicaciones 4 a 7 para detectar la infección por el parásito *Neospora caninum* en animales, a partir de una muestra biológica.

19. Uso de polinucleótidos según la reivindicación 9 para detectar la presencia de ácidos nucleicos específicos de *Neospora caninum* en animales, a partir de una muestra biológica.

FIGURA 1A

A. MICROSATÉLITE MS1A Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 1

```
<210> 1
<211> 299
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 1
tttcaactgt caacagatac ttttttctag ttcgactcac cgcaacacat gcccacagcg 60
acagatacgc gccatatgca ggcgcgggca ggagcatgca cgcttgcgac aagtatatat 120
ataaatatat atatgtatat atgtataaat atatatatat gtatatatgt ataaatatat 180
atatatatat gtatatatgt ataaatatat atatatatgt atatgtatat atatgcaagg 240
ccggtgtgtg gaccttcggc tgaagctgag gagttcgtcg aggtgtatgg cgagtgatg 299
```

B. MICROSATÉLITE MS1B Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 2

```
<210> 2
<211> 228
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 1
gaaagacgat tccccatttc aaactgcaaa cgtctcagca aatacaagtg acctcttgcg 60
cccgaggttc ttcgtatgca cacacatcta catatatata tatatataca tatatgcatt 120
tccatatgga ttacatgtg tagaaaatat agatgtgtat gtttgatgtt gtgactctcg 180
atgcatctgc ctgcacgcgc atgtggaggt tttcttgtga atgcagca 228
```

FIGURA 1B

C. MICROSATÉLITE MS2 Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 3

<210> 3
<211> 202
<212> DNA
<213> *Neospora caninum*

<400> 1
cggtagaggc gaagtcgaac tcctctgctg ttttattgga cgcgagggtc tcaccgaaaa 60
gctgcatata tatatatattg tatcatatat atatatatat atatatgtat atcccaagta 120
accgcggcat gtgtggactc cacacctagt ctttagacac aacttcctgc cccagagtgt 180
ctgcctgcgt cttccgttct cg 202

D. MICROSATÉLITE MS3 Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 4

<210> 4
<211> 186
<212> DNA
<213> *Neospora caninum*

<400> 1
ccactgtcgt atgaatgcat atatatatat atatatatat aattatgtag atgtacctgt 60
atctatacat atgtacgtgt gccttgattg ctgcaccatg ccgttttgtg gcctgtttta 120
cgaaggagaa gggattcccc tttcatttca tttgcagaaa attgacaaga gctgcagcct 180
caccat 186

FIGURA 1C

E. MICROSATÉLITE MS4 Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 5

```
<210> 5
<211> 235
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 1
cggcgtagtg catcttctgt ttttatctgt cgaaagacgc ttggcgtcac cacacttttt 60
cctttgcata ttggcacact tgtacgcgca tactgttcgc acatctacac ctctgcatat 120
atatatatat atatatatat atacatttat atacgtgggc gtataagcgt gggcgtgttt 180
gggcagtgcg cgcggtgtac gtgggaggag aggggcgggt ttcgcgacgc ttgac 235
```

F. MICROSATÉLITE MS5 Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 6

```
<210> 6
<211> 267
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 1
tcaggactcc gtcacaccgg tgaaggcagt ctcgctctgat atggcgcaca catgacagct 60
ttaacacgtg cgtatgtaaa taggcatgcg agagaatacc ccggtttacg tggacagacc 120
tgacgggctg aaagtcccag acggtcgacg gtgacataag gcggatacgc gcagagatgt 180
gcgtatatat atatatatat atgtaggcct ttcgcctggg cgctgccacg ttgacacgct 240
agtactttgt ctcggggcga ggaggcg 267
```

FIGURA 1D

G. MICROSATÉLITE MS6A Y MS6B Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 7

<210> 7
 <211> 391
 <212> DNA
 <213> *Neospora caninum*
 <400> 1
 gagctcgcca atagatctga ggaaccctca aagtgcaaag tgcattgtttg tatcccttga 60
 agctatatat atatatatat atatatatat atatatatataa cttcatatgc atatgaatgt 120
 ctgggtctcgc actcatggga ttttgttaggc cgatgcgtgc ttacccatcg acccctctgc 180
 atagctgtcc atctgtgtgt ctgcataata tgcacacatg catctaaagc tgcgtgcatg 240
 taactattat tegtgcattgc gcaaaatact gacatccata tatatatata tatatatata 300
 tgtacatgca taccacgtgt gtacgattac gtttagcagag gcggccgatt gcgcgaccac 360
 gacagagggg ttggaccgtg gtcattctttg t 391

H. MICROSATÉLITE MS7 Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 8

<210> 8
 <211> 219
 <212> DNA
 <213> *Neospora caninum*
 <400> 1
 cacgacagtg actctccata catcccgcgc tgcctccgtc gctgcacact tgcattgcacc 60
 tatacgtctt cagaccataa tatatatata tatatatata tatatagggg ataggcgacg 120
 acggcgagtg ttgcgtgtgt gcgttccttg cggagagagc gctagggagt cgattgacag 180
 gggctgtggg ggctgtctta cgggagagga gggactgaa 219

FIGURA 1E

I. MICROSATÉLITE MS8 Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 9

```
<210> 9
<211> 193
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 1
agcgcgaaac tcttgccaac agatttccac gtgtctcttc cgtgtacggc tattgcaagg 60
cacaaaggtc cccgaaaaat ttcattgctga catatatata tatatatata tatatatata 120
tatggatacg cttctttcaa agttggcagt tttgactgaa gcttttttcg aatgcggaat 180
cccgtctttc cgc 193
```

J. MICROSATÉLITE MS10 Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 10

```
<210> 10
<211> 279
<212> DNA
<213> Neospora caninum

<400> 1
ttctctccgc tttctccaaa tttaaaaggc ctttcggaag tctcccgagc tgtgacctcc 60
ctcgtgtcgt actcgtagta gtagtactac tactactact actagaagaa gaagaagaag 120
aagaagaaga agaagaagaa gaagaagaag aagaagaaga agaagatgat gatgatgatg 180
atgatgatga tgatgacaat ctacgtcaat ctacgtcaaa cagggatgtg caagtacctg 240
caaggaagag ctataggaag agagaaagga gaataaagg 279
```

FIGURA 1F

K. MICROSATÉLITE MS12 Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 11

<210> 11
 <211> 247
 <212> DNA
 <213> *Neospora caninum*

<400> 1
 tgtttttttg agttccttgc aaaactcggg agaaattcgg gacccaaggg gaagtggaca 60
 ctctggggggc tgaggggcaac cgtctcgttt ctggccagga gcaaaagcta ctcaagagac 120
 agcaagatcg gcgcatttcc gctccgatgc tctgcgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 180
 tgtgtgtgtg cccgagtctc gtttgttatt aattgccgtc gtctgcgtgt tcggagtctc 240
 ttgtacc 247

L. MICROSATÉLITE MS21 Nc-Spain 1H. SEQ ID NO.: 12

<210> 12
 <211> 248
 <212> DNA
 <213> *Neospora caninum*

<400> 1
 ggagccccgt actcctggat ggtgagacgg ttgaatcggg ctggtcccta atcgtttacc 60
 acgagttccc tccaacatgc atatatacat gtacatacat acatacctac atacatacat 120
 acatacatac atttcccccc gctctttctc aaacgtttcc tttggccgag cttgcacata 180
 taaaaagtat aacatccagg cggcgatgga atcagcatgt tcacttttgg tgaaggggag 240
 ggtagaaa 248

FIGURA 2

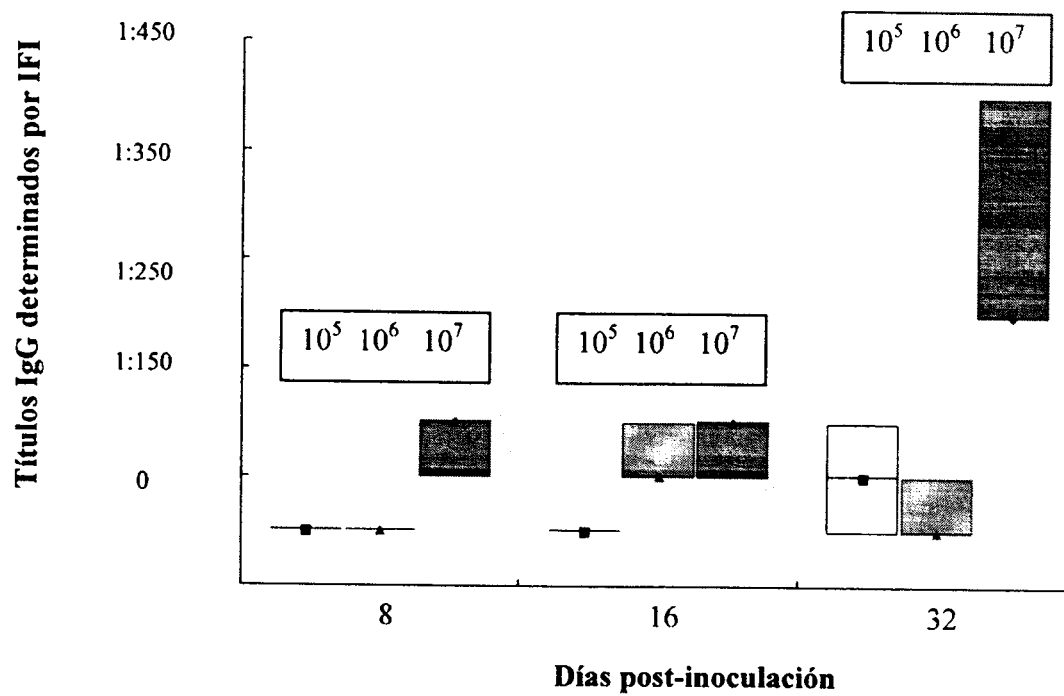


FIGURA 3A

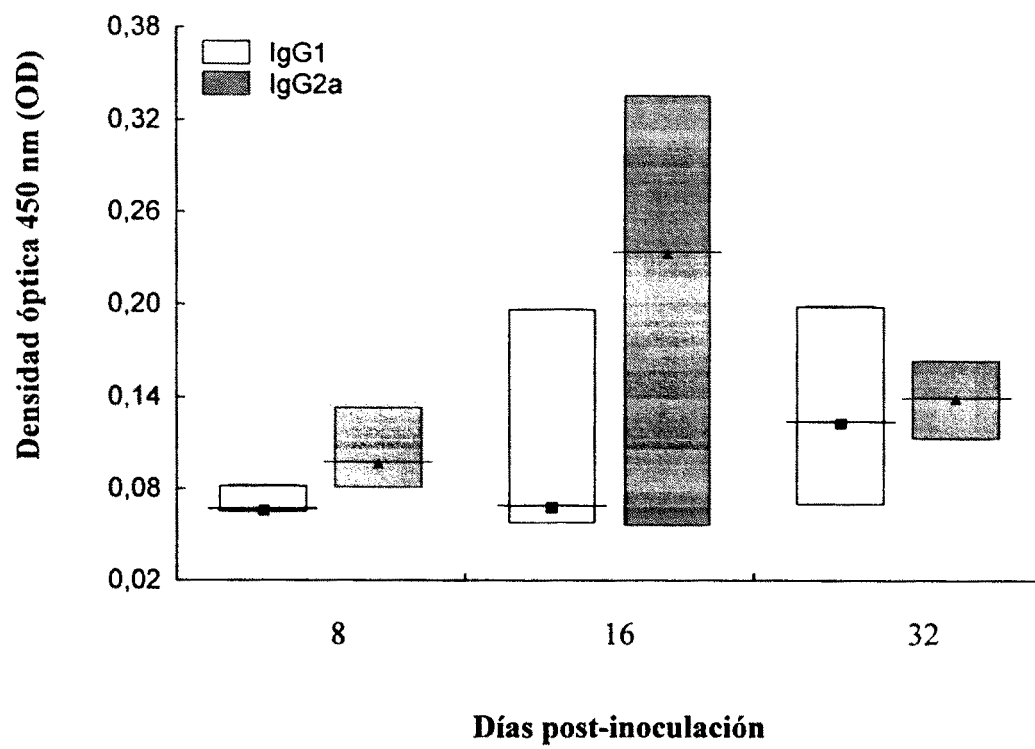


FIGURA 3B

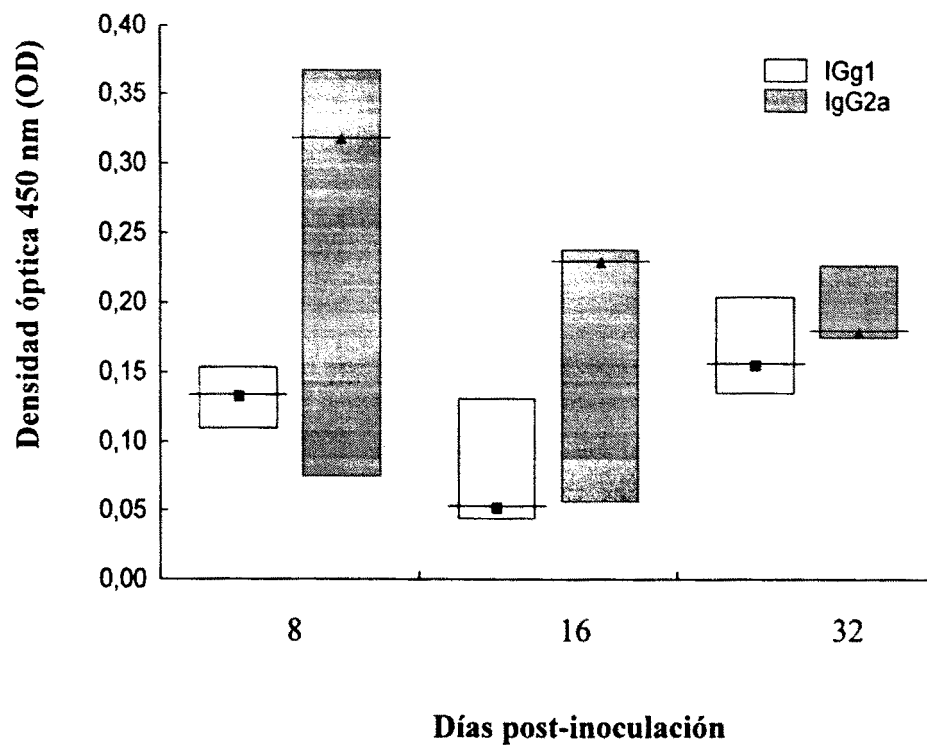


FIGURA 3 C

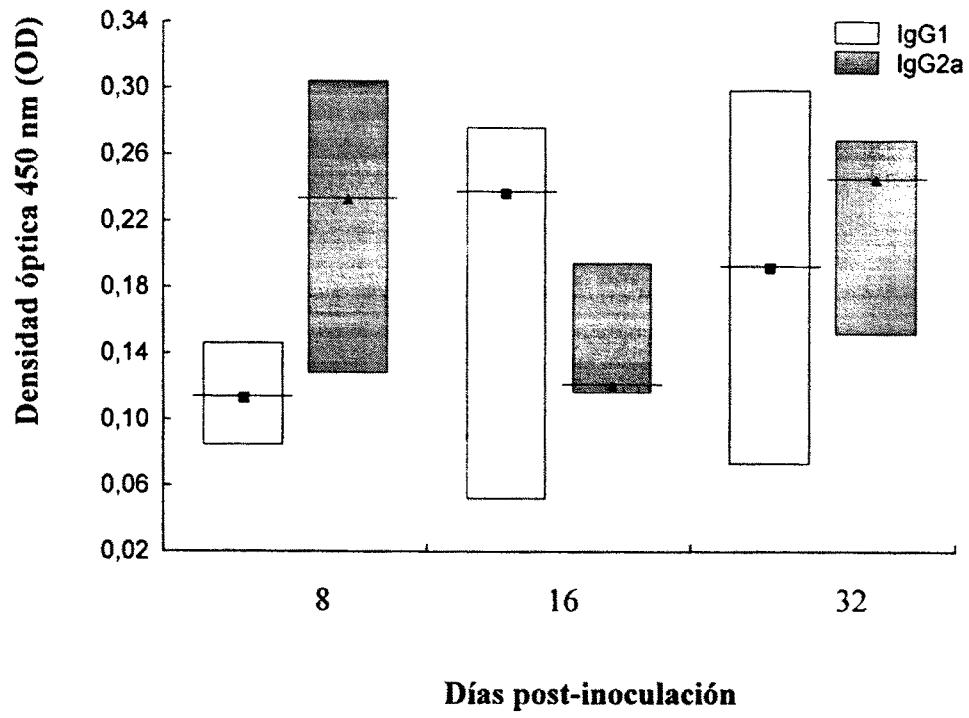


FIGURA 4

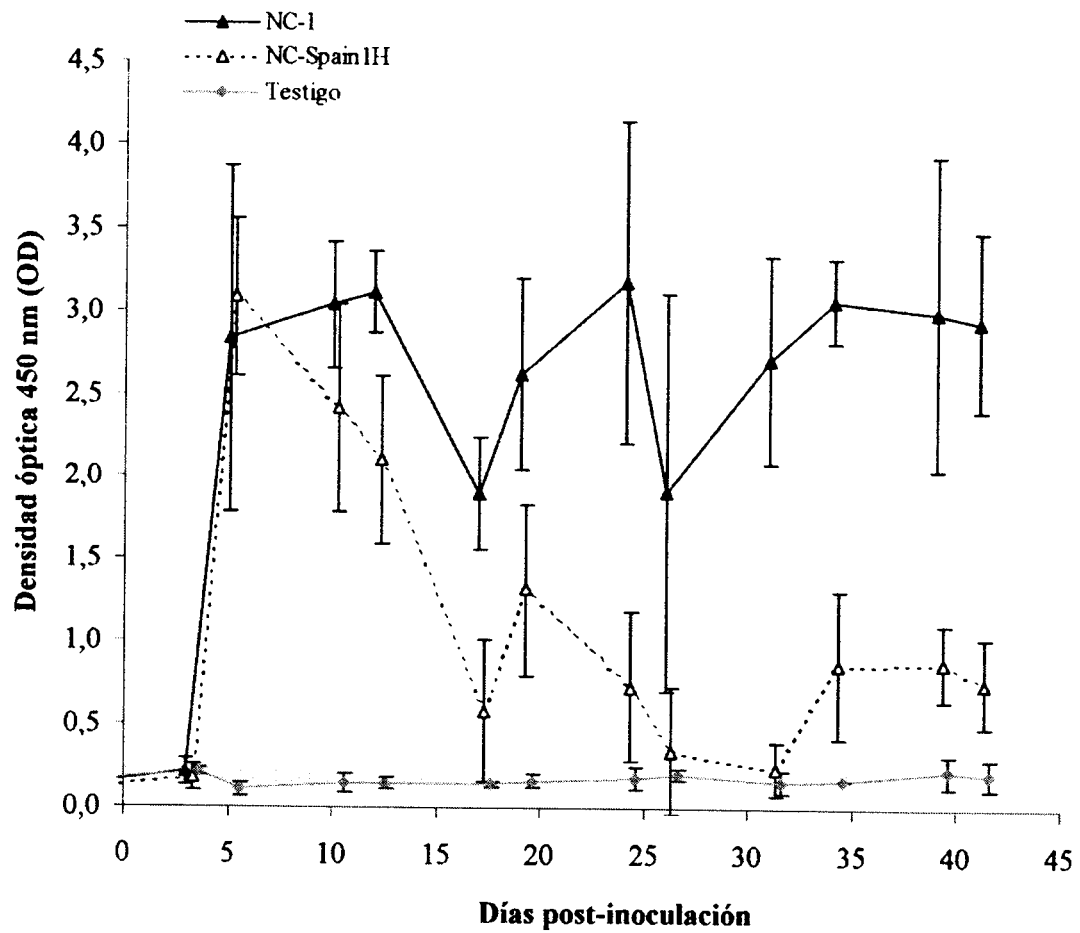


FIGURA 5

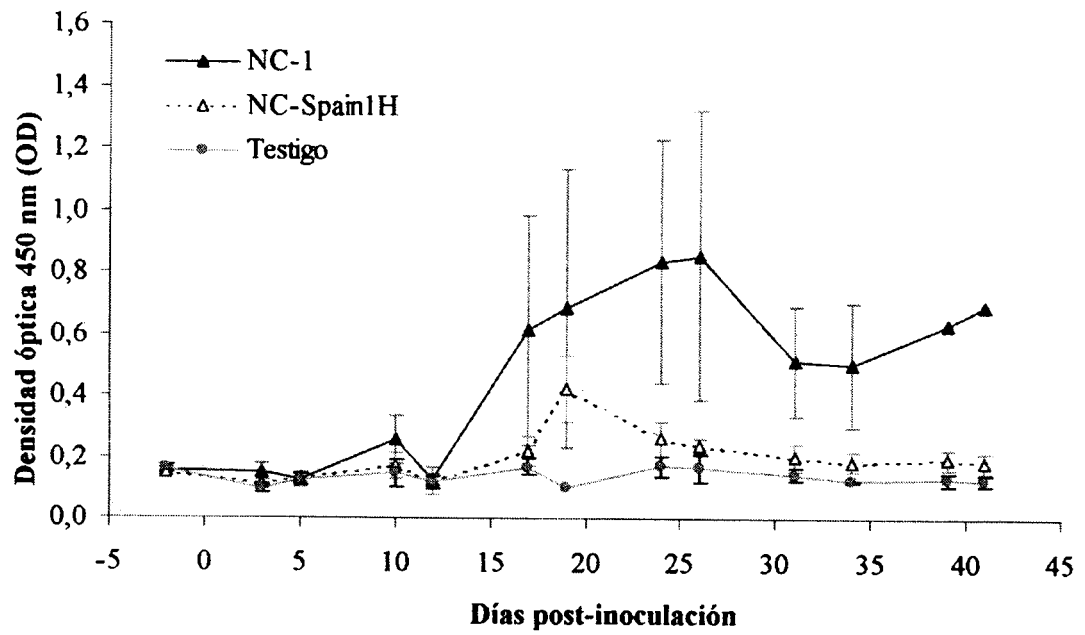


FIGURA 6A

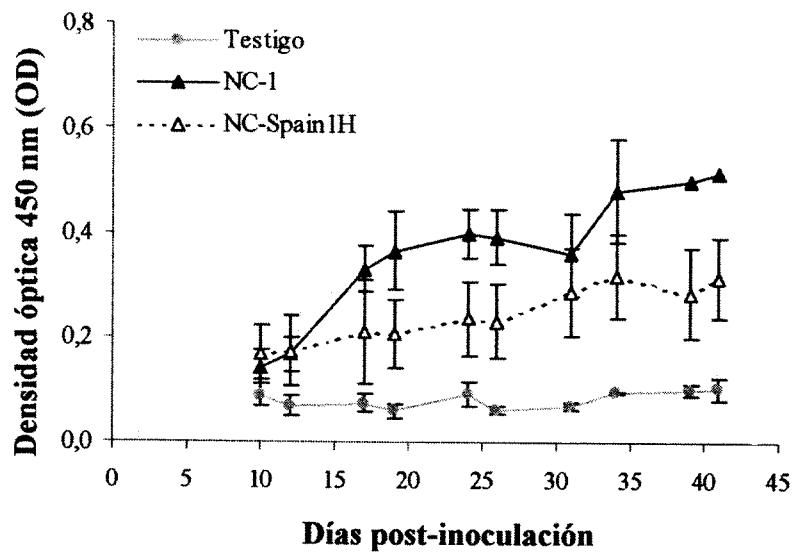
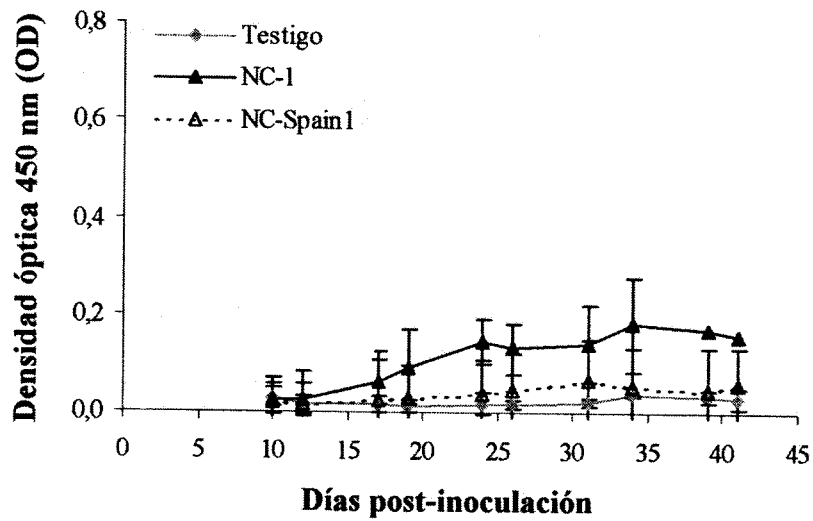


FIGURA 6B





OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

⑪ ES 2 319 242

⑫ Nº de solicitud: 200503163

⑬ Fecha de presentación de la solicitud: **23.12.2005**

⑭ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ **Int. Cl.:** Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑯ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	WO 0210340 A1 (UNIV SYDNEY TECH & ELLIS JOHN TIMOTHY et al.) 07.02.2002, todo el documento.	1-7,10-18

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

21.04.2009

Examinador

J. Manso Tomico

Página

1/2

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

C12N 1/10 (2006.01)

C07K 16/20 (2006.01)

A61K 35/68 (2006.01)

A61K 39/012 (2006.01)