



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 253 035**

② Número de solicitud: 200301762

⑤ Int. Cl.:  
**C12Q 1/68** (2006.01)

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

② Fecha de presentación: **25.07.2003**

④ Fecha de publicación de la solicitud: **16.05.2006**

Fecha de la concesión: **22.02.2007**

⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.03.2007**

⑥ Fecha de publicación del folleto de la patente:  
**16.03.2007**

⑦ Titular/es: **Universidad Complutense de Madrid  
Rectorado-Avenida de Séneca, 2  
28040 Madrid, ES**

⑧ Inventor/es: **Ortega Mora, Luis Miguel;  
Collantes Fernández, Esther;  
Regidor Cerrillo, Javier y  
Ferre Pérez, Ignacio**

⑨ Agente: **No consta**

⑩ Título: **Procedimiento para la cuantificación de *Neospora caninum* en muestras de semen bovino.**

⑪ Resumen:

Procedimiento para la cuantificación de *Neospora caninum* en muestras de semen bovino.

La presencia de *N. caninum* en muestras de semen bovino se cuantifica mediante una PCR cuantitativa en tiempo real, la cual utiliza el sistema SYBR Green I. Para la extracción del ADN del parásito de semen, se separa el fluido seminal de la fracción celular y se extrae el ADN de cada una de las fracciones utilizando una prueba comercial. Si es semen congelado con diluyente, la muestra se pasa a través de una columna de cromatografía de Sephacryl S-400 y el ADN se precipita con isopropanol y glicógeno. La cuantificación de *N. caninum* se realiza mediante interpolación del Ct (ciclo umbral: ciclo en el que una muestra es considerada positiva) sobre una curva estándar construida con concentraciones conocidas de ADN del parásito frente a sus respectivos Ct. Para la cuantificación del ADN del hospedador se realiza con otra curva estándar con concentraciones conocidas de ADN genómico.

ES 2 253 035 B1

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

**DESCRIPCIÓN**

Procedimiento para la cuantificación de *Neospora caninum* en muestras de semen bovino.

**5 Objeto de la invención**

La presente invención, según se expresa en el enunciado de esta memoria descriptiva, se refiere a un procedimiento para la cuantificación de *N. caninum* en muestras de semen. De forma más concreta, la invención se refiere a la normalización y aplicación de la técnica de PCR cuantitativa en tiempo real para la cuantificación del ADN del parásito *N. caninum* en muestras de semen bovino fresco o congelado. Lo anteriormente expuesto posee una gran relevancia, ya que la aplicación de esta técnica permitirá la cuantificación de *N. caninum* en semen. Este hecho posee valiosas aplicaciones, particularmente en la especie bovina, donde la inseminación artificial es una práctica habitual y la utilización de técnicas diagnósticas sensibles y específicas se hace necesaria a la hora de determinar el estado sanitario de los sementales bovinos, especialmente en centros de inseminación artificial y en explotaciones en extensivo, donde la monta natural tiene gran importancia.

**Antecedentes de la invención**

*Neospora caninum* es un protozoo parásito del grupo de los Apicomplexa descrito desde 1989 como agente productor de aborto y mortalidad neonatal en el ganado bovino (Thilsted & Dubey 1989, J. Vet. Diagn. Invest. 1: 205-09). La infección también se ha descrito en otros hospedadores como la cabra, oveja, caballo, camello, búfalo de agua, ciervo, coyote y zorro, aunque la enfermedad tiene una mayor importancia en los bovinos y en el perro (Dubey 1999, Vet. Parasitol. 84: 349-67).

La neosporosis bovina está considerada como una enfermedad parasitaria de distribución cosmopolita y una de las causas más frecuentes de fallo reproductivo en los diversos países donde se ha estudiado (Trees *et al.*, 1999, Int. J. Parasitol. 29: 1195-2000; Anderson *et al.*, 2000, Anim. Reprod. Sci. 60: 417-431), incluido España (González *et al.*, 1999, Vet. Rec. 144: 145-150; Pereira-Bueno *et al.*, 2003 Vet. Parasitol. 111: 143-152). La manifestación clínica más importante de la infección es el aborto en las hembras gestantes y generalmente tiene lugar entre el tercer y noveno mes de gestación, siendo más frecuente en torno a los 5-6 meses. Los terneros afectados que nacen vivos pueden presentar problemas neuro-musculares, apareciendo los primeros signos clínicos a los 4-5 días post-parto, aunque estos pueden retrasarse hasta transcurridas dos semanas. Sin embargo, lo más frecuente es el nacimiento de terneros clínicamente sanos, pero crónicamente infectados (Dubey & Lindsay 1996, Vet. Parasitol. 67: 1-59).

En relación con la transmisión de la enfermedad, los estudios más recientes indican la importancia relativamente escasa de la transmisión postnatal y la persistencia, durante toda la vida, de la infección congénita (Davison *et al.*, 1999, Int. J. Parasitol. 29: 1683-1689; Hietala & Thurmond 1999, Int. J. Parasitol. 29: 1669-1676). La eliminación del parásito en el semen y su posible transmisión venérea o mediante la inseminación artificial viene respaldada por diversos hechos epidemiológicos, tales como la coincidencia temporal del aumento en el título de anticuerpos en hembras al comienzo de la etapa reproductora (Hietala & Thurmond 1999, Int. J. Parasitol. 29: 1669-1676; Pereira-Bueno *et al.*, 2000, Int. J. Parasitol. 30: 906-909), la presencia de anticuerpos específicos frente a la infección por el parásito en sementales bovinos (Caetano da Silva *et al.*, enviado a Vet. Parasitol. para su publicación), pero sobre todo la eliminación seminal demostrada en otros parásitos taxonómicamente muy próximos como *Toxoplasma gondii* (Spence *et al.*, 1978, Vet. Rec. 102: 38-9; Dubey & Sharma 1980, Am. J. Vet. Res. 41: 749-795).

La posibilidad de contaminación del semen bovino por agentes infecciosos y parasitarios, y su posible transmisión a las hembras receptoras se ha convertido en una de las principales preocupaciones tanto para las autoridades sanitarias como para el sector productivo (Hare 1985, p. 117, In: Office International des Epizooties technical series n° 4). Tanto los sementales como su semen, están sometidos a un programa sanitario estricto que incluye diagnósticos periódicos de las enfermedades más importantes de acuerdo con su historia natural. En este sentido, la normalización y aplicación de técnicas que permitan el estudio de las posibles vías de eliminación y transmisión de la neosporosis, así como el estado sanitario de los sementales bovinos, especialmente de centros de inseminación artificial, es de suma importancia.

En la actualidad en la bibliografía científica se han descrito diversas técnicas de PCR para la detección del ADN del parásito (Dubey 1999, Vet. Parasitol. 84: 349-367), así como una PCR en tiempo real para la cuantificación del parásito en muestras de tejido infectadas (Collantes-Fernández *et al.*, 2002, J. Clin. Microbiol. 40: 1194-1198). Sin embargo, estas técnicas no se encuentran normalizadas para la cuantificación del parásito en semen fresco o congelado. Los fenómenos de inhibición en la PCR para la detección de diversos agentes infecciosos en semen han sido descritos anteriormente por varios autores (Christopher-Hennings *et al.*, 1995, J. Clin. Microbiol. 33: 1730-1734; Santurde *et al.*, 1996, Vet. Microbiol. 49: 81-92; Van Engelenburg *et al.*, 1993, J. Clin. Microbiol. 31: 3129-3235).

**Descripción de la invención**

*Procedimiento para la cuantificación de Neospora caninum en muestras de semen bovino*

El procedimiento objeto de la invención tiene por finalidad la cuantificación de *N. caninum* en muestras de semen bovino frescas o congeladas con objeto de determinar la utilización del animal (o de su semen) con fines reproductivos.

En este sentido, tomando como referencia los métodos de extracción de ADN a partir de semen descritos en la bibliografía científica (Von Beroldingen *et al.*, 1990; p. 209-223. In H. A. Erlich (ed.) Stockton Press, New York; Van Engelenburg *et al.*, 1993, J. Clin. Microbiol. 31: 3129-3235), la presente invención proporciona un procedimiento para la extracción de ADN del parásito a partir de muestras de semen y su posterior cuantificación por técnicas basadas en la técnica de PCR en tiempo real. El procedimiento que se preconiza, resuelve de forma plenamente satisfactoria la problemática anteriormente expuesta y permite la cuantificación específica de pequeñas cantidades de ADN parasitario en muestras procedentes de semen bovino tanto frescas como congeladas.

La técnica que se ha estandarizado para la cuantificación de *N. caninum* en muestras de semen ha sido una PCR cuantitativa en tiempo real que emplea el sistema SYBR Green I, la cual ha mostrado previamente una elevada especificidad y sensibilidad en tejidos infectados. Esta técnica también ha sido aplicada para la cuantificación del gen 28S rRNA del hospedador con el fin de poder comparar la carga parasitaria en diferentes muestras y corregir la presencia de potenciales inhibidores en la PCR. Esta técnica presenta la ventaja sobre las técnicas de PCR convencionales de permitir una cuantificación de ADN, mayor rapidez en el procesado, posibilidad de realizar la lectura de las muestras en placas de 96 pocillos y no necesitar de revelado posterior en geles de agarosa. Además, la ventaja de la utilización de una PCR cuantitativa en tiempo real con SYBR Green I radica en que no es necesario la utilización de sondas fluorescentes, pudiéndose usar para la cuantificación, tanto del parásito como del gen del hospedador.

### Descripción de los dibujos

Para complementar la descripción y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características del invento, se acompaña a la presente memoria descriptiva, como parte integrante de la misma, un dibujo en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

La figura 1. (A) Curva estándar para la cuantificación de *N. caninum* construida con diluciones decimales seriadas de ADN extraído de taquizoítos de cultivo celular. En la curva estándar están representados los valores de Ct (ciclo umbral: ciclo en el que una muestra es considerada positiva *versus* logaritmo del número de taquizoítos). (B) Curva estándar para la cuantificación del ADN del hospedador construida con diluciones 1:5 seriadas de ADN genómico extraído del hospedador. En la curva estándar están representados los valores de Ct *versus* logaritmo de nanogramos de ADN.

### Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra con los siguientes ejemplos:

#### Ejemplo 1

##### *Extracción del ADN de N. caninum en muestras de semen fresco*

Para la extracción del ADN de *N. caninum* en muestras de semen se ha normalizado un método de extracción utilizando una prueba comercial: "Genomic-Prep cell and tissue DNA isolation kit" (Amershan Biosciences). Con el fin de determinar la sensibilidad de la PCR cuantitativa específica de *N. caninum* en muestras de *semen fresco*, se procedió a contaminar alícuotas de 250  $\mu$ l de semen fresco bovino con diluciones decimales seriadas de taquizoítos vivos obtenidos previamente de cultivo celular ( $10^4$ -0 taquizoítos/muestra). En primer lugar, se procedió a la separación del fluido seminal y la fracción celular del semen según está descrito (Van Engelenburg *et al.*, 1993, J. Clin. Microbiol. 31: 3129-3235). Para ello, se centrifugaron las muestras de semen contaminadas con el parásito a 12000 x g durante 3 min. El sobrenadante (fluido seminal: F1) se separó del sedimento de células (fracción celular: F2) transfiriéndose a un tubo limpio. Posteriormente se añadió a la fracción F1 un volumen equivalente del tampón de lisis de ADN suministrado en la prueba comercial, y proteinasa K (Sigma) (200  $\mu$ g/ml) y se incubó en baño María a 60°C durante 1 hora. El sedimento procedente de la fracción celular se resuspendió en 600  $\mu$ l del tampón de lisis de ADN con proteinasa K (concentración final 200  $\mu$ g/ml), incubándose también en baño María a 60°C durante 1 h.

Terminada la incubación se añadió una RNasa (concentración final 20  $\mu$ g/ml) al lisado de cada fracción y se incubó a 37°C durante 30 min. Posteriormente, para la purificación del ADN, se añadió 200  $\mu$ l de una solución para la precipitación de las proteínas, contenida en la prueba comercial. Se agitó la muestra vigorosamente durante 20 s y se centrifugó a 13000-16000 x g durante 5 min. Las proteínas precipitadas formaron un sedimento blanquecino. El sobrenadante de las muestras se transfirió a un tubo limpio y el sedimento con las proteínas se eliminó.

Finalmente, se procedió a la precipitación del ADN añadiendo 600  $\mu$ l de isopropanol 100% frío (guardado a -20°C), se invirtieron las muestras 50 veces y se incubaron a -20°C durante 30 min. A continuación, se procedió a la centrifugación de las muestras a 13000-16000 x g/ 15 min, y se eliminó el sobrenadante con cuidado de no desprender el ADN precipitado, que aparece como un pequeño sedimento. El sedimento de ADN se lavó con 600  $\mu$ l de etanol al 70% frío (-20°C), y seguidamente se centrifugaron las muestras a 13000-16000 x g durante 5 min. Después se desechó el etanol y se dejaron secar las muestras al aire hasta la completa evaporación del alcohol. El sedimento se resuspendió en 50  $\mu$ l de la solución de hidratación de ADN contenida en el kit y se dejó toda la noche a temperatura ambiente hasta su completa hidratación. Por último las muestras se conservaron a -20°C hasta la realización de la PCR.

## ES 2 253 035 B1

### Ejemplo 2

#### *Extracción del ADN de N. caninum en muestras de semen congelado*

5 Para la extracción del ADN parasitario a partir de semen congelado y la determinación de la sensibilidad de la PCR cuantitativa en este tipo de muestra, se mezcló semen con un diluyente comercial (mezcla de Tris, glicerol, antibióticos y yema de huevo), preparándose alícuotas de 250  $\mu$ l las cuales se contaminaron con diluciones decimales seriadas de taquizoitos vivos ( $10^4$ -0 taquizoitos) y posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido.

10 Con el fin de eliminar los potenciales inhibidores presentes en las muestras de semen congelado, debidas a los diluyentes, y tomando como referencia el método descrito por Santurde *et al.*, (1996, Vet. Microbiol. 49: 81-92) se pasó todo el volumen de las muestras (250  $\mu$ l) a través de una columna de cromatografía de Sephacryl S-400 (Amersham Pharmacia). Para el montaje de la columna se añadió 2 ml de Sephacryl S-400 a un soporte de polypropylene (Bio-Rad). La columna se colocó en un tubo de centrífuga y se centrifugó a 1000 x g durante 2 minutos. El equilibrado de la columna se realizó añadiendo 2 ml de solución 0,3 M de acetato sódico pH 5,3 y se centrifugó de nuevo a 1000 x g  
15 durante 2 min. Este procedimiento se repitió tres veces. El último equilibrado de la columna se hizo con un volumen de 250  $\mu$ l de TE pH 7,5 y la columna se sometió a otra centrifugación.

Preparada la columna se colocó un tubo de 1,5 ml (sin la tapa) dentro de un tubo de centrífuga y se introdujo la columna de Sephacryl S-400. A continuación se añadió sobre la columna, 250  $\mu$ l de la muestra de semen congelada y se centrifugó a 1000 x g durante 2 min. Se recogió el filtrado en el tubo, el cuál se procesó siguiendo el mismo procedimiento que para el semen fresco, separando también las dos fracciones: fluido seminal y fracción celular. La única modificación en el procedimiento de extracción del ADN radica en el paso de precipitación con isopropanol, en el cual se añadió 1  $\mu$ l glicógeno a 20 mg/ml a los 600  $\mu$ l de isopropanol.  
20

Una vez extraído el ADN se procedió a determinar la sensibilidad de la PCR cuantitativa en las muestras de semen fresco y congeladas contaminadas con diluciones decimales seriadas de taquizoitos de *N. caninum*.  
25

### Ejemplo 3

#### *Cuantificación de N. caninum en muestras de semen*

La cuantificación de *N. caninum* en muestras de semen se realizó a partir del ADN extraído de muestras de semen según se ha descrito en los ejemplos 1 y 2, y se empleó una PCR cuantitativa utilizando el sistema SYBR Green I (Collantes-Fernández *et al.*, 2002, J. Clin. Microbiol. 40: 1194-1198). Los oligonucleótidos diseñados, PF20 (SEQ ID NO:1) y PR21 (SEQ ID NO:2) amplifican un fragmento de 76 pb de la región Nc-5 del genoma de *N. caninum* (Kaufmann *et al.*, 1995, Mol. Cell. Prob. 10: 289-297) entre 247 y 323 pb (GenBank accession no. X84238). Un método similar fue empleado para la cuantificación del gen 28S rRNA del hospedador (GenBank accession no. X00525), los oligonucleótidos diseñados para este gen PF28S (SEQ ID NO:3) y PR28S (SEQ ID NO:4) amplifican un fragmento de ADN de 71 pb. La mezcla de PCR (25  $\mu$ l) consistió en 5  $\mu$ l de ADN, 20 pmoles de cada oligonucleótido (Amersham Biosciences), 1 x SYBR Green PCR Buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M de dATP, dCTP, y dGTP, 400  $\mu$ M dUTP, 0,625 U de Amplitaq Gold ADN polimerasa, 0,25 U de AmpErase UNG (uracil-*N*-glycosilase), todo incluido en el "kit SYBR Green PCR Core" (Applied Biosystems). La amplificación consistió en un ciclo de 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, y 40 ciclos de 95°C durante 15 s y 60°C durante 1 min). Las reacciones para la cuantificación de *N. caninum* y el gen 28S rRNA se realizaron en tubos separados en un termociclador ABI 7700 Prism Sequence Detector (Applied Biosystems). A la vista de la figura 1, la cuantificación de *N. caninum* se realizó mediante interpolación del Ct (ciclo umbral: ciclo en el que una muestra es considera positiva) sobre una curva estándar construida con concentraciones conocidas de ADN del parásito ( $10^4$ -0,1 taquizoitos) frente a sus respectivos Ct. Para la cuantificación del ADN del hospedador se construyó otra curva estándar con concentraciones conocidas de ADN genómico (500-4 ng). La determinación del valor del Ct y el número de copias se calculó mediante el software Sequence detector 7700 (Applied Biosystems).  
35  
40  
45  
50

La sensibilidad de la PCR cuantitativa sobre muestras de semen fresco fue de 1 taquizoito por reacción, amplificándose la muestra de semen fresco contaminada con 10 taquizoitos. El ADN del parásito fue cuantificado en la fracción celular.  
55

El procedimiento descrito fue aplicado a muestras de semen fresco y congelado procedentes de toros de centros de inseminación los cuales eran seropositivos frente a *N. caninum*. El ADN del parásito fue cuantificado en varias muestras tanto de semen fresco como congelado y siempre en la fracción celular, en las cuales se pudo cuantificar hasta 1 taquizoito en 60 ng de ADN.  
60

65

# ES 2 253 035 B1

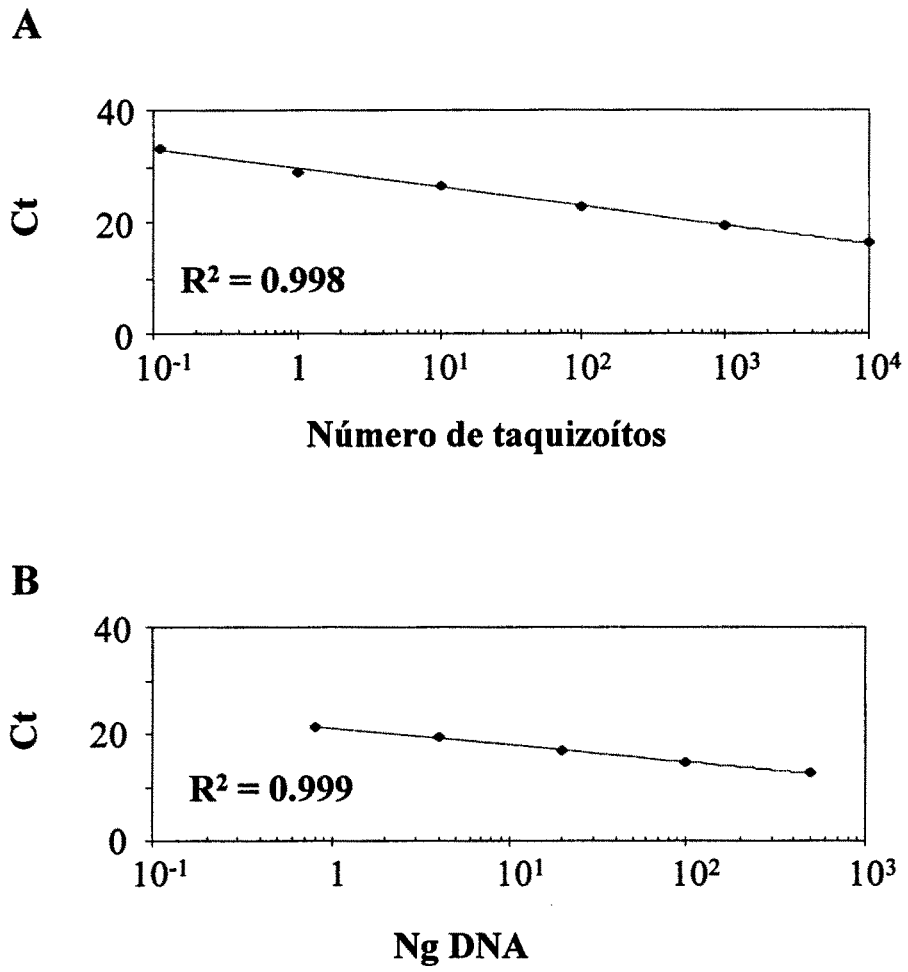
## REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para la cuantificación del ADN del parásito *N. caninum* en semen bovino, **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

- 10 a). Separación del fluido seminal (fracción F1) y fracción celular (F2) del semen por centrifugación.
- b). Aislamiento del ADN de cada fracción mediante el uso de una prueba comercial, sometiendo las muestras a una digestión con proteinasa K a 60°C durante 1 h y un tratamiento con una RNAsa a 37°C durante 30 min.
- 15 c). Realización de una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando el sistema SYBR Green I, para la amplificación del ADN del parásito empleando como oligonucleótidos los descritos en SEQ ID NO: 1 y 2 con los que se obtiene un fragmento de 76 pb de la región Nc-5 del genoma de *N. caninum*.
- d). Cuantificación del ADN del parásito por interpolación del valor de Ct de la muestra en una curva estándar construida con concentraciones conocidas del ADN del parásito.
- 20 e). Realización de una reacción de PCR cuantitativa en tiempo real, utilizando el sistema SYBR Green I, para la amplificación del ADN del hospedador empleando como oligonucleótidos los descritos en SEQ ID NO: 3 y 4 con los que se obtiene un fragmento de ADN de 71 pb del gen 28S rRNA.
- 25 f). Cuantificación del ADN del hospedador por interpolación del valor de Ct de la muestra en una curva estándar construida con concentraciones conocidas de ADN genómico.

2. Procedimiento para la cuantificación del ADN del parásito *N. caninum* en gimen bovino, según reivindicación 1, **caracterizado** porque para muestras de semen congelado con diluyente, la extracción del ADN del parásito requiere:

- 30 - El paso a través de una columna de cromatografía de Sephacryl S-400 antes de proceder a la separación de la fracción F1 y F2.
- La precipitación del ADN con isopropanol con glicógeno.



**FIGURA-1**

# ES 2 253 035 B1

## LISTA DE SECUENCIAS

<110> Universidad Complutense de Madrid

5 <120> Procedimiento para la cuantificación de *Neospora caninum* en muestras de semen bovino

<140> 200301762

10 <141> 2003-07-25

<160> 4

15 <210> 1

<211> 20

<212> DNA

20 <213> *Neospora caninum*

<400>

25 ACTGGAGGCA CGCTGAACAC 20

<210> 2

<211> 21

30 <212> DNA

<213> *Neospora caninum*

<400>

35 AACAAATGCTT CGCAAGAGGA A 21

<210> 3

40 <211> 20

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

45 <400>

TGCCATGGTA ATCCTGCTCA 20

50 <210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> *Neospora caninum*

55

<400>

CCTCAGCCAA GCACATACAC C 21

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 253 035

② Nº de solicitud: 200301762

③ Fecha de presentación de la solicitud: 25.07.2003

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: C12Q 1/68 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	COLLANTES-FERNANDEZ, E. et al., "Quantitative detection of Neospora caninum in bovine aborted fetuses and experimentally infected mice by real-time PCR.", J. CLIN. MICROBIOL., 2002, Vol. 40, No. 4, páginas 1194-1198. Todo el documento.	1-6
A	US 5942394 A (ELLIS et al.) 24.08.1999, columna 2, línea 65 - columna 3, línea 4; columna 12, líneas 52-67; reivindicación 21.	1-6
A	BASZLER, T.V. et al., "Detection by PCR of Neospora caninum in fetal tissues from spontaneous bovine abortions.", J. CLIN. MICROBIOL., 1999, Vol. 37, No. 12, páginas 4059-4064. Todo el documento.	1-6
A	PEREIRA-BUENO, J. et al., "Evaluation by different diagnostic techniques of bovine abortion associated with Neospora caninum in Spain.", VET. MICROBIOL., 2003, Vol. 111, No. 2-3, páginas 143-152. Todo el documento.	1-6
A	DUBEY, J.P., Review of Neospora caninum and neosporosis in animals.", KOREAN J. PARASITOL., 2003 Mar, Vol. 41, No. 1, páginas 1-16. Todo el documento.	1-6
A	MOORE, D.P. et al., "Serological evidence of Neospora caninum infections in beef bulls in six counties of the Corrientes province, Argentina.", VET. PARASITOL., 2003 Jun 25, Vol. 114, No. 4, páginas 247-252. Todo el documento.	1-6

**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**

24.04.2006

**Examinador**

J.L. Vizán Arroyo

**Página**

1/1