

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 301 273**

21 Número de solicitud: 200500392

51 Int. Cl.:
C12Q 1/68 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **25.07.2003**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.06.2008**

Fecha de la concesión: **08.04.2009**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.05.2009**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
01.05.2009

62 Número de la solicitud inicial: **200301762**

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

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

74 Agente: **No consta**

54 Título: **Procedimiento para la valoración de la viabilidad de *Neospora caninum* en muestras de semen bovino.**

57 Resumen:

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

La viabilidad de *N. caninum* en muestras de semen bovino se determina mediante bioensayo, inoculando a ratones BALBc nu/nu la fracción celular de las muestras de semen bovino. La aparición de síntomas compatibles con la infección y/o la cuantificación del ADN del parásito por PCR cuantitativa en muestras de encéfalo demuestra la viabilidad del parásito en la muestra seminal.

ES 2 301 273 B1

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la valoración de la viabilidad 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 valoración de la viabilidad de *N. caninum* en muestras de semen. De forma más concreta, la invención se refiere a la normalización de la determinación de la viabilidad del parásito *N. caninum* en muestras de semen fresco o congelado mediante bioensayo en ratones de la estirpe BALB/c nu/nu. Lo anteriormente expuesto posee una gran relevancia, ya que la aplicación de esta técnica permitirá determinar la viabilidad o capacidad infectiva 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.

Además, en la bibliografía científica se ha descrito la detección y aislamiento del parásito *Toxoplasma gondii*, filogenéticamente relacionado a *N. caninum*, mediante bioensayo por el método de inoculación en un modelo murino susceptible a la toxoplasmosis (Derouin *et al.*, 1987, J. Clin. Microbiol. 25: 1597-1600), método empleado para demostrar su eliminación seminal (Spence *et al.* 1978, Vet. Rec. 102: 38-9; Dubey & Sharma 1980, Am. J. Vet. Res. 41: 749-95). Sin embargo, hasta la fecha, no se ha descrito el desarrollo de un método normalizado para determinar la viabilidad y por tanto la capacidad infectante de *N. caninum* en semen mediante un bioensayo con hospedadores sensibles a la neosporosis como el gerbo o ratones inmunocomprometidos.

Descripción de la invención

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

El procedimiento objeto de la invención tiene por finalidad la valoración de la capacidad infectante 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.

ES 2 301 273 B1

La presente invención se refiere a un procedimiento normalizado para la valoración de la viabilidad de *N. caninum* en semen. El procedimiento se basa en la inoculación de las muestras de semen en ratones atímicos de la estirpe BALBc nu/nu, hospedador sensible a la infección por *N. caninum*. La aparición de síntomas compatibles a la infección y la cuantificación de ADN específico de *N. caninum* en encéfalo del ratón inoculado, demuestra la capacidad infectiva de las muestras analizadas.

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra con los siguientes ejemplos:

Ejemplo 1

Valoración de la viabilidad de N. caninum en muestras de semen fresco

La normalización del procedimiento para determinar la sensibilidad del bioensayo en muestras de semen, comprende la evaluación de la capacidad infectiva de taquizoítos de *N. caninum* inoculados en semen fresco y semen sometido a un proceso de dilución en crioprotectores y congelación.

Con el fin de determinar la sensibilidad del bioensayo en muestras de *semen fresco*, se procedió a contaminar alícuotas de 250 μ l de semen bovino con distintas cantidades de taquizoítos vivos obtenidos en cultivo celular. Para ello, tras el recuento de taquizoítos viables en una cámara Neubauer con azul tripán al 0,05%, se realizaron diluciones decimales seriadas en tampón fosfato (PBS) estéril y se contaminaron diferentes alícuotas con 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10, 1 y 0 taquizoítos por muestra. Inmediatamente después se procedió a la separación del fluido seminal y la fracción celular del semen de las diferentes alícuotas mediante centrifugación a 1350 x g durante 10-15 minutos, se retiró el sobrenadante (fluido seminal) y el sedimento fue resuspendido en 500 μ l de PBS con Penicilina G (1000 U/ml) y Estreptomicina (100 μ g/ml). Las diferentes alícuotas se conservaron a 4°C durante un periodo inferior a los 30 minutos hasta la inoculación por vía intraperitoneal en ratones atímicos de la estirpe BALBc nu/nu.

Ejemplo 2

Valoración de la viabilidad de N. caninum en muestras de semen congelado

Respecto a las muestras de *semen congelado*, alícuotas de semen fresco se mezclaron con un diluyente comercial (mezcla de Tris, glicerol, antibióticos y yema de huevo) como crioprotector y se prepararon alícuotas de 250 μ l, las cuales fueron contaminadas con diluciones decimales seriadas de taquizoítos vivos preparados con el mismo procedimiento descrito para el semen fresco. Posteriormente, las diferentes alícuotas contaminadas con 1×10^5 , 1×10^4 , 1×10^3 , 1×10^2 , 10, 1 y 0 taquizoítos por muestra se congelaron mediante inmersión en vapores de nitrógeno durante 10 minutos y, a continuación, se conservaron durante 48 horas en nitrógeno líquido. Antes de su inoculación en ratones de la estirpe BALBc nu/nu, las diferentes alícuotas fueron descongeladas mediante inmersión directa en un baño de agua a 37°C e inmediatamente después inyectadas a ratones hembras de la estirpe BALBc nu/nu de aproximadamente 20-25 gramos de peso. Después de la inoculación, los animales fueron observados diariamente para detectar la aparición de síntomas compatibles con neosporosis, incluyendo desórdenes nerviosos, anorexia y letargia (Yamage *et al.*, 1996, J. Parasitol. 82: 172-179). Cuando aparecieron síntomas clínicos compatibles o bien transcurridos 4 meses desde el momento de la inoculación los ratones fueron sacrificados mediante inhalación de CO₂. En la necropsia se retiró el encéfalo en condiciones asépticas y se procedió a la extracción de ADN de una porción de aproximadamente 20 mg, utilizando una prueba comercial: "Genomic-Prep cell and tissue DNA isolation kit" (Amershan Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante y 5 μ l de la solución de ADN resultante (100-200 ng) se utilizó como molde para la PCR cuantitativa en tiempo real, según se describe en la solicitud de patente 200301762.

Los ratones BALBc nu/nu inoculados con las alícuotas de semen fresco contaminadas con 1×10^2 taquizoítos o cantidades superiores desarrollaron síntomas compatibles con la infección entre los 25-30 días postinoculación. Por lo tanto, la sensibilidad del procedimiento fue de 1×10^2 taquizoítos en muestras de semen fresco. Igualmente, los ratones inoculados con las muestras de semen congelado contaminadas con 1×10^4 o cantidades superiores de taquizoítos desarrollaron síntomas compatibles con la infección a los 25-30 días postinoculación.

ES 2 301 273 B1

REIVINDICACIONES

5 1. Procedimiento para valorar la viabilidad del parásito *N. caninum* en muestras de semen bovino, **caracterizado** porque se realiza mediante bioensayo en ratones de estirpe nude o atímica, y que comprende las siguientes etapas:

a). Separación del fluido seminal y fracción celular del semen.

b). Inoculación en ratones de estirpe nude o atímica de la fracción celular.

10 c). Seguimiento de los ratones inoculados para la detección de los síntomas propios de la neosporosis y/o posterior cuantificación del ADN del parásito mediante la utilización de la técnica de la PCR cuantitativa en tiempo real a partir de encéfalo.

15 2. Procedimiento para valorar la viabilidad del parásito *N. caninum* en muestras de semen bovino, según reivindicación 1, **caracterizado** porque la muestra es semen congelado con diluyente.

20 3. Procedimiento para valorar la viabilidad del parásito *N. caninum* en muestras de semen bovino, según reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque los animales utilizados en el bioensayo son de la estirpe BALB/c nu/nu.

25

30

35

40

45

50

55

60

65



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 301 273

② Nº de solicitud: 200500392

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.	1-3
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.	1-3
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.	1-3
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.	1-3
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.	1-3
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.	1-3

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
23.05.2008

Examinador
J.L. Vizán Arroyo

Página
1/1