

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 377 508**

51 Int. Cl.:

**C12N 1/10** (2006.01)

**A61K 39/002** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

**C12Q 1/68** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06450073 .9**

96 Fecha de presentación: **12.05.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1721965**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **15.11.2006**

54 Título: **Procedimiento para la producción y la aplicación de cultivos de protozoos**

30 Prioridad:  
**12.05.2005 AT 8152005**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**28.03.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**28.03.2012**

73 Titular/es:  
**VETERINÄRMEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN  
VETERINÄRPLATZ 1  
1210 VIENNA, AT**

72 Inventor/es:  
**Hess, Michael**

74 Agente/Representante:  
**Carpintero López, Mario**

ES 2 377 508 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la producción y la aplicación de cultivos de protozoos

La invención se refiere a la producción y la aplicación de cultivos de protozoo de *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*

5 La enfermedad de la cabeza negra, tifohepatitis o histomoniasis en pavos se describió por primera vez por Smith (1895). Pudieron obtenerse conocimientos esenciales para la etiología mediante los ensayos de Tyzzer (1920). En este trabajo se describen por primera vez flagelos y pseudópodos, como criterio principal morfológico del agente patógeno, lo que clasificaba al agente patógeno como protozoo. La morfología del parásito y la existencia en pavos condujo a la denominación *Histomonas meleagridis*. El conocimiento de que el parásito pueda aparecer también en  
10 gallinas, condujo a la recomendación de mantener separadas estas especies animales. Como especies de aves sensibles adicionales se describen especialmente gallina de guinea, faisán, pavo real y codorniz, mientras que las aves acuáticas no cuentan como sensibles (McDougald, 2003). Mediante la patogenia y la elevada prevalencia de la enfermedad en pavos esta especie ha de considerarse seguramente como uno de los huéspedes más sensibles.

15 En los dos últimos años se produjo en Europa una aparición intensificada de la enfermedad. Un motivo es especialmente la prohibición de agentes profilácticos y terapéuticos adecuados, con cuya ayuda se había combatido de forma controlada la enfermedad durante décadas. No obstante, el uso profiláctico de agentes terapéuticos en pavos, especialmente de nifursol, derivados de imidazol, tales como nitroimidazol y dimetridazol, como aditivos de alimentos para animales está prohibido en la Unión Europea (véase EEC1798/1995, EEC2205/2001 y EEC1756/2002), dado que la inocuidad de estas sustancias (carcinogenicidad y genotoxicidad) no ha de descartarse para el consumidor. También Nitarsone usada en Norteamérica para la profilaxis (ácido 4-nitrofenilarsónico) no tiene autorización en Europa. Como consecuencia de este estado de necesidad absoluta de profilaxis y de terapia en distintos países de Europa, tras el brote de la enfermedad en poblaciones de pavos, en los dos últimos años debieron realizarse medidas de sacrificio (Hess y col., 2004).

25 En el caso de las gallinas ponedoras la enfermedad transcurre más suavemente, pero mediante la cría alternativa creciente se produce también en este caso una aparición multiplicada (Hafez y col., 2001; Esquetet y col., 2003).

Trabajos fundamentales sobre la propagación de *Histomonas meleagridis* en medios de cultivo celular se realizaron por Dwyer (1970) y más tarde por Stepkowski (1978). Como base sirve a ambos autores material de heces o aislados de heces, que se propagan en condiciones agnotobióticas. Por consiguiente es posible una propagación del agente patógeno sólo en un medio correspondiente, lo que se determina principalmente mediante la flora acompañante.  
30

En conjunto, los cultivos anteriores tienen la desventaja de que no son uniformes genéticamente, dado que consisten en varios agentes patógenos una y la misma especie. Además no está garantizado que se encuentren en el cultivo también otros protozoos, que son difíciles de diferenciar morfológicamente. La existencia de distintos protozoos en el intestino del ave de corral se describe con frecuencia (McDougald, 2003), lo que subraya insistentemente esta problemática.  
35

Como consecuencia de los cultivos poco caracterizados se usan resultados de experimentos *in vitro* e *in vivo*, en los que se usan tales cultivos, para valorar moderadamente. Las pruebas fiables de sustancias, tanto *in vitro* como *in vivo*, requieren un cultivo genéticamente uniforme, para impedir que determinados efectos se deban a la presencia de distintas subpoblaciones u otras especies de protozoo. Los resultados de ensayos en animales, que se realizaron en el pasado reciente, reflejan esta heterogeneidad (Hu y McDougald, 2003; Hu y col., 2004; Landmann, 2004).  
40

La heterogeneidad de cultivos requiere que determinadas subpoblaciones dominen de forma fenotípica, lo que proporciona falsas conclusiones sobre la sensibilidad general de un agente patógeno. Este problema se describe a modo de ejemplo para el agente patógeno de la malaria, *Plasmodium falciparum* (Rosario, 1981; Trager y col., 1981; Burkot y col., 1984; LeBras y col., 1983). Como consecuencia de ello existe el riesgo de que en el contexto de las pruebas *in vitro* tiene lugar únicamente una selección y propagación de cepas resistentes, lo que no permite ninguna conclusión sobre la sensibilidad de un agente patógeno. Indicaciones sobre posibles subpoblaciones diferentes de *Histomonas meleagridis* existen a partir del trabajo de Gerbod y col. (2001). Los autores han secuenciado a partir de 4 aislados partes del ARN ribosómico, esta sección genética se usa con frecuencia para análisis filogenéticos, y han determinado una ligera heterogeneidad en algunas posiciones. Los autores concluyen a partir de esto que esto podría ser una indicación para subpoblaciones diferentes. Indicaciones seguras sobre subpoblaciones dentro de las tres especies de protozoo mencionadas anteriormente existen de *Tetratrichomonas gallinarum*, tal como se notifica por Cepicka y col. (2005). También de *Blastocystis sp.* está documentada con todo detalle la diversidad genética, también en cuanto a una posible problemática de zoonosis (Noel y col., 2003; Noel y col., 2003).  
45  
50

En Kulda y col. (1974) se realizaron experimentos de infección con *Tetratrichomonas gallinarum* y a este respecto con un aislado se desencadenó la enfermedad de la cabeza negra típica para *Histomonas meleagridis*. Se mostró que este cultivo de infección de *Tetratrichomonas gallinarum* estaba contaminado con *Histomonas meleagridis*, basándose en el ensayo de heces microscópico.  
55

En Goedbloed y Bool (1962) se infectaron pavos tanto con un cultivo de *Histomonas meleagridis* como *Tetratrichomonas gallinarum* y a continuación se realizaron ensayos histológicos. Tras una infección mixta se detectaron ambos agentes patógenos microscópicamente en las heces. Esto muestra el riesgo de que con el reaislamiento de cultivos de protozoo se aislen varios cultivos, dado que no se conoce un medio selectivo.

5 Bayon y Bishop (1937) describen el aislamiento de *Histomonas meleagridis* a partir del hígado de una gallina, que se usó para el diagnóstico. De las heces del animal se aisló una mezcla de *Blastocystis*, *Trichomonas* y *Chilomastix*, pero ninguna histomona. Asimismo esto muestra claramente que en el caso de cultivos de protozoo se trata en la mayoría de los casos de coinfección o coaislamiento.

10 Bishop (1938) describe también el aislamiento de *Trichomonas*, *Chilomastix* y *Blastocystis* del intestino ciego de una gallina.

En Norton y col. (1999) se describe la presencia de *Histomonas meleagridis* y *Tetratrichomonas gallinarum* tras infección con el nematodo *Ascaridia dissimilis*.

Esto muestra que hasta la fecha no se conocían cultivos clonales de protozoos y asimismo no podían estar disponibles.

15 En el documento EP 600 396 A2 se dan a conocer procedimientos y agentes para la prevención o para el tratamiento de infecciones intestinales por protozoos, especialmente de *Giardia lamblia*. A este respecto se cultiva y separan en primer lugar cepas de *Giardia lamblia* de diferente origen, destruyéndose los protozoos obtenidos por medio de ultrasonidos, para obtener una vacuna correspondiente tras concentración y tratamiento adicionales.

20 En el documento GB 902 760 se describen procedimientos para la producción de endoparásitos atenuados, en los que se usa radiación ultravioleta para atenuar los mismos.

El documento FR 2 853 550 se refiere a un aditivo alimentario para la administración a animales, que comprende ácido cinámico, aldehído y tiosulfato. A este respecto se muestra que una mezcla que contiene estas sustancias puede combatir de manera eficaz protozoos tales como *Tetratrichomonas gallinarum* e *Histomonas meleagridis*.

25 Tan Kevin y col. (Experimental Parasitology 96(1) (2000): 9-15) se refiere al cultivo de cultivos de *Blastocystis hominis* sobre agar sólido.

El documento US 5 824 537 se refiere, entre otras cosas, a un procedimiento para la clonación *in vitro* de parásitos del género *Babesia*, obteniéndose células de parásitos individuales a partir de una suspensión de eritrocitos infectados, pudiendo usarse estas células individuales finalmente para la producción de un cultivo.

30 Clark y col. (Clinical Microbiology Reviews 15(3) (2002): 329-341) es un artículo de revisión sobre procedimientos para el cultivo de protozoos, describiéndose entre otras cosas el cultivo de *Blastocystis hominis*.

Debido a la diversidad genética, pero especialmente a la existencia simultánea de varios protozoos en un animal, son indispensables métodos diagnósticos exactos. Esto se refuerza porque evidentemente *Tetratrichomonas gallinarum* e *Histomonas meleagridis* pueden provocar modificaciones morfológicas y síntomas similares (Tyzzer, 1920; Allen, 1941).

35 El diagnóstico de la histomoniasis se dificulta especialmente porque el parásito muere rápidamente en el mundo exterior y de este modo ya no puede detectarse. Si bien existe la posibilidad del cultivo del agente patógeno a partir de animales de sangre caliente, sin embargo son necesarias condiciones especiales para garantizar la supervivencia de los trofozoítos (Dwyer, 1970; McDougald y Galloway, 1973). La detección directa del agente patógeno puede realizarse por lo tanto sólo por medio de histología. Para ello se describen varios métodos, especialmente la reacción de ácido peryódico-Schiff (reacción PAS), por medio de la cual puede detectarse el agente patógeno afectado en el tejido (Kemp y REID, 1966). No obstante este método requiere mucho trabajo y tiempo, lo que subraya la necesidad de alternativas. La histología se dificulta también porque el agente patógeno no puede diferenciarse fácilmente de macrófagos y células de hongos, lo que subraya adicionalmente la necesidad de mejores posibilidades de diagnóstico. Esquenet y col. (2003) describen la detección citológica por medio de tinción directa de preparaciones de molde.

40

45

Hasta ahora no existen métodos de detección diagnósticos moleculares para la detección sensible y específica de los tres agentes patógenos.

50 Es objetivo de la invención establecer cultivos clonales de *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* y aplicar los cultivos así establecidos *in vitro* e *in vivo*, para superar las desventajas del estado de la técnica, especialmente la falta de homogeneidad de los cultivos de protozoo conocidos hasta ahora de aves de corral. Además es un objetivo desarrollar diagnósticos específicos para que sea posible una detección segura de agentes patógenos y una delimitación entre los agentes patógenos.

Por consiguiente con la presente invención se proporciona un cultivo clonal de protozoos que comprende células protozoarias de una única especie de protozoo, que se caracteriza porque la especie de protozoo se selecciona del

grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*, conteniendo el cultivo bacterias simbióticas o sus lisados.

Según la presente invención se denomina como "cultivo clonal de protozoos" un cultivo de células protozoarias que procede de una única célula de protozoo, que es o bien *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* o bien *Blastocystis sp.* y que por lo tanto se formó a partir de las mismas. El cultivo consiste por lo tanto en células protozoarias que proceden todas de la propagación de una única célula. Las células protozoarias son por lo tanto copias de una única célula de partida indicada anteriormente. Si bien en el cultivo clonal pueden encontrarse otros organismos, tales como bacterias, en cambio es esencial para la invención que sólo esté presente una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* en el cultivo clonal, es decir el cultivo contiene células protozoarias de una de estas especies de protozoo, pero no células protozoarias de las otras dos especies de protozoo en cada caso (por ejemplo *Histomonas meleagridis* pero no *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*, *Tetratrichomonas gallinarum* pero no *Histomonas meleagridis* y *Blastocystis sp.*).

La provisión de un cultivo clonal de este tipo no pudo tener lugar hasta ahora en el estado de la técnica, a pesar de las necesidades existentes desde hace al menos 20 a 30 años (véase anteriormente Dywer o Stepkowski), y posibilita ahora en cambio una multiplicidad de aplicaciones, que llegan desde la producción de vacunas y agentes terapéuticos contra las especies de protozoos indicadas en el presente documento hasta una investigación y caracterización más cercana de las mismas en especies de protozoos parasitarias en aves de corral.

En el caso de la producción de cultivos clonales de protozoos es por un lado decisivo posibilitar el crecimiento de las células protozoarias mediante la provisión de las correspondientes condiciones ambientales (por ejemplo temperatura, presencia de bacterias simbióticas, fuentes de carbono) *in vitro* y por otro lado individualizar los protozoos. La individualización tiene lugar preferentemente mediante micromanipulación, propagándose tras esta individualización los protozoos en un medio de crecimiento correspondiente (el medio de crecimiento debería comprender en este caso una fuente de hidratos de carbono, especialmente un almidón, tal como almidón de arroz, almidón de maíz, y eventualmente sales, especialmente sales de Earle, aminoácidos, especialmente L-glutamina, y antibióticos/antimicóticos, especialmente penicilina, estreptomina y anfotericina), para dar como resultado finalmente un cultivo clonal de protozoos.

El cultivo de protozoos según la invención contiene bacterias simbióticas y/o sus lisados.

Se sabe que *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* pueden propagarse de forma eficaz en presencia de bacterias simbióticas o sus productos metabólicos (por ejemplo en forma de lisado) *in vitro*. Por este motivo se encuentran preferentemente bacterias simbióticas y/o sus lisados en el cultivo de protozoos según la invención, dado que éstos se utilizan en la producción de los cultivos. A este respecto se usan preferentemente aquellas bacterias (y/o lisados), que también *in vivo* se encuentran en simbiosis con los protozoos. Naturalmente es también posible eliminar las bacterias esencialmente de forma completa del cultivo de protozoos (por ejemplo mediante centrifugación o filtración), siempre que las células protozoarias se usen por ejemplo para examinar las condiciones de crecimiento, para la producción de vacunas y anticuerpos.

Según una forma de realización preferida las bacterias son enterobacterias, especialmente bacterias coliformes, estafilococos, estreptococos o mezclas de los mismos.

Dado que *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* se obtienen preferentemente a partir de heces, el cultivo bacteriano se compone preferentemente por las especies de bacterias que se encuentran en las mismas. Según la invención se determinó que en las heces de aves de corral además de enterobacterias también están presentes estafilococos y estreptococos, que pueden usarse individualmente o en combinación para el cultivo de células protozoarias.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a una formulación de vacuna que comprende células protozoarias clonales vivas o inactivadas de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* o un anticuerpo dirigido contra células protozoarias clonales de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*

La provisión de cultivos o células clonales de protozoos posibilita una producción de vacunas controlada, que puede usarse por un lado para la inmunización activa y por otro lado para la inmunización pasiva de aves de corral. En la producción de vacunas activas es necesario tener un antígeno lo más homogéneo posible. En el caso concreto es deseable poner a disposición un cultivo clonal de protozoos, que contenga esencialmente sólo una especie de protozoo, contra la que se vacunará un animal. El uso de los cultivos clonales según la invención posibilita una producción industrial normalizable y mejorada decisivamente de esta vacuna, sobre todo en cuanto a una mejor reproducibilidad y menor varianza de cargas. Por ejemplo una vacuna activa, que se utiliza para la inmunización de aves de corral contra *Histomonas meleagridis*, contendrá esencialmente sólo células de *Histomonas meleagridis*. Si este no es el caso, en determinadas circunstancias puede llegarse a que se produzca un proceso de selección, que no prefiera necesariamente la especie deseada. Es decir es entonces completamente posible que el ave de corral no

se inmunice o se inmunice de manera insuficiente contra el agente patógeno deseado sino contra uno o varios antígenos distintos que se encuentran en el cultivo (por ejemplo otros protozoos). Por el contrario, en el caso de vacunas pasivas es importante que se usen en su mayor parte anticuerpos que actúan específicamente contra los antígenos que han de combatirse (por ejemplo células protozoarias). Por lo tanto es decisivo que en la producción de vacunas de este tipo se usen cultivos de partida lo más puros posible. Para ello son adecuados especialmente los cultivos clonales de protozoos según la invención.

La formulación de vacuna comprende preferentemente un adyuvante.

Para promover la respuesta inmunitaria contra un antígeno, en la producción de vacunas activas se usan adyuvantes, seleccionándose el adyuvante preferentemente del grupo constituido por adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, hidróxido de aluminio, *Bordetella pertussis*, saponina, muramil dipéptido, copolímeros de etileno-acetato de vinilo, aceite, preferentemente un aceite vegetal o un aceite mineral, especialmente aceite de cacahuete o aceite de silicona, y combinaciones de los mismos así como los adyuvantes descritos en Singh y col. (Nat. Biotech 17 (1999), 1075-1081).

El experto conoce suficientemente adyuvantes adecuados, que pueden usarse según la invención (véase por ejemplo O'Hagan, Derek T. (2000) "Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols", Humana Press; documento US 5.885.589; documento EP 109 942).

Las células protozoarias clonales se atenúan preferentemente mediante pase, mediante radiación, especialmente mediante radiación UV y radioactiva, mediante sustancias químicas o mediante virus.

Para reducir la patogenia de las células protozoarias usadas en la vacuna, pueden atenuarse estas células. Una atenuación puede tener lugar según la invención mediante varios métodos. Según la invención se ha comprobado que sobre todo, los procedimientos de atenuación indicados anteriormente son especialmente muy adecuados para reducir la patogenia de las células protozoarias. Especialmente se usa preferentemente la atenuación mediante varios pases (al menos 10, preferentemente al menos 50, aún más preferentemente al menos 100 pases). Con el pase se propagan los protozoos en primer lugar en un frasco de cultivo y tras alcanzar una densidad celular determinada (por ejemplo tras 12 horas, preferentemente tras 24 horas, aún más preferentemente tras 48 horas, de cultivo) en una relación de por ejemplo 1:10, 1:50, 1:20 ó 1:5 se transfieren a un nuevo medio.

Según una forma de realización preferida las células protozoarias clonales se inactivan mediante calor, formalina, beta-propiolactona o combinaciones de los mismos.

Alternativamente o además de la atenuación de las células protozoarias éstas pueden inactivarse también mediante varios procedimientos. Mediante la inactivación de las células se reduce drásticamente el riesgo de una infección del animal vacunado.

La formulación de vacuna está adaptada preferentemente para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral o intracloacal.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para la producción de un cultivo de cultivo clonal de protozoos que comprende células protozoarias de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* que comprende las etapas de:

- a) proporcionar una muestra de partida que comprende células protozoarias de al menos una especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*,
- b) cultivar las células de la muestra de partida en un medio de cultivo que comprende una fuente de hidratos de carbono y bacterias de al menos una especie de bacteria, que viven *in situ* de forma simbiótica con las células protozoarias,
- c) individualizar las células protozoarias por medio de micromanipulación,
- d) cultivar las células protozoarias individualizadas en un medio de cultivo tal como se define en b) y
- e) eventualmente determinar la pureza del cultivo clonal de protozoos.

La muestra de partida es preferentemente heces o tejido.

Dado que *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* pasan una parte de su ciclo vital en el intestino de aves de corral, las heces son especialmente adecuadas para aislar estos protozoos y producir a partir de los mismos cultivos clonales de protozoos.

Según una forma de realización preferida la muestra de partida se proporciona por un ave de corral seleccionada del grupo constituido por pavo, gallina, faisán, pavo real, codorniz y gallina de guinea.

*Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* son parásitos que particularmente infestan las especies de ave de corral anteriores. Por lo tanto los protozoos se aíslan preferentemente de estos animales.

La fuente de hidratos de carbono es preferentemente almidón, especialmente almidón de arroz, de maíz o de patata.

Se ha comprobado que *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* prefieren sobre todo almidón como fuente de carbono y pueden degradar el mismo mediante captación en el interior de la célula.

5 Las bacterias son preferentemente enterobacterias, especialmente bacterias coliformes, estafilococos, estreptococos o mezclas de los mismos.

Según la invención se ha comprobado que *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* pueden cultivarse especialmente mediante simbiosis con las bacterias indicadas anteriormente (o sus lisados). Sin la presencia de estos cultivos bacterianos, que se aíslan preferentemente de las heces de aves de corral, los protozoos no pueden sobrevivir ni cultivarse *ex vivo*. Por lo tanto es decisivo que las bacterias estén presentes tanto antes como tras la individualización en cada etapa de cultivo *ex vivo*, siempre que se desee la viabilidad de los protozoos.

Preferentemente el medio de cultivo contiene además sales, especialmente sales de Earle, aminoácidos, especialmente L-glutamina, y antibióticos/antimicóticos, especialmente penicilina, estreptomycinina y anfotericina.

15 Según una forma de realización preferida la pureza del cultivo se determina por medio de una técnica de amplificación de ácido nucleico o técnica de hibridación o por medio de una técnica inmunológica con anticuerpos dirigidos contra células protozoarias clonales de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*

20 La determinación de la pureza sirve sobre todo para confirmar la presencia del parásito que va a aislarse o la presencia de células no deseadas en el cultivo clonal de protozoos de otras especies de protozoo. Para la determinación de la pureza pueden usarse varios métodos, prefiriéndose en cambio técnicas de amplificación de ácido nucleico y técnicas de hibridación y técnicas inmunológicas. El conocimiento de regiones de ácido nucleico específicas de especie o conservadas dentro del genoma del protozoo posibilita identificar sondas o cebadores específicos (por ejemplo mediante superposición de secuencia), producir y utilizar (por ejemplo PCR, transferencia de tipo Southern, hibridación *in situ*). El experto conoce suficientemente técnicas de este tipo (véase por ejemplo "Current Protocols in Molecular Biology", Ed Fred M. Ausubel y col., Wiley Inc.). Debido a la posibilidad de producir, con ayuda de la presente invención, cultivos clonales de protozoos con una única especie de protozoo, es además posible producir anticuerpos específicos contra esta especie de protozoo y utilizarlos para determinar la pureza de los cultivos (por ejemplo por medio de ELISA, RIA).

30 Preferentemente se usan los oligonucleótidos 5'-GAAAGCATCTATCAAGTGGAA-3' y 5'-GATCTTTTCAAATTAGCTTTAAA-3' para la determinación de *Histomonas meleagridis*, 5'-GCAATTGTTTCTCCAGAAAGTG-3' y 5'-GATGGCTCTCTTTGAGCTTG-3' para la determinación de *Tetratrichomonas gallinarum*, 5'-TAACCGTAGTAATTCTAGGGC-3' y 5'-AACGTTAATATACGCTATTGG-3' para la determinación de *Blastocystis sp.*

35 Estos oligonucleótidos han resultado ser especialmente adecuados para determinar las especies de protozoo individuales, dado que éstos se unen a aquellas regiones del genoma, que codifican para el ARN ribosómico (ARNr), que a su vez recurren a la caracterización filogenética de organismos. Los oligonucleótidos se determinan debido la superposición de secuencias de datos de secuencia de ARNr accesibles al público de *Histomonas meleagridis* (AF293d56), *Tetratrichomonas gallinarum* (AF124608) y *Blastocystis sp.* (AF408427).

40 Según el procedimiento según la invención puede obtenerse un cultivo clonal de protozoos cuya especie de protozoo esté seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para la determinación de la influencia de sustancias o mezclas de sustancias sobre células protozoarias de una especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* que comprende las etapas de:

- 45
- proporcionar un cultivo clonal de protozoos según la invención,
  - eventualmente ajustar el recuento de células del cultivo de protozoos,
  - poner en contacto y cultivar el cultivo clonal de protozoos con un medio de cultivo según la invención,
  - añadir al menos una sustancia o al menos una mezcla de sustancias que puede ejercer potencialmente una influencia sobre células protozoarias,

50

  - determinar el recuento de células protozoarias en el cultivo de protozoos,
  - comparar el recuento de células protozoarias y la flora acompañante antes y después de la adición de la al menos una sustancia o de la al menos una mezcla de sustancias.

55 La provisión de un cultivo clonal de protozoos posibilita además poner a disposición un procedimiento que sea adecuado para examinar la influencia de sustancias o mezclas de sustancias sobre el comportamiento de crecimiento y sobre la viabilidad de protozoos específicos. Dado que hasta la fecha no era posible producir cultivos clonales de protozoos que sólo comprendieran una única especie de protozoo (*Histomonas meleagridis*,

*Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis* sp.), tampoco pudo realizarse ningún ensayo con el que pudiera mostrarse en qué medida determinadas sustancias repercuten en el metabolismo de una especie de protozoo concreta. Un procedimiento de este tipo es de importancia decisiva en la investigación de nuevos agentes terapéuticos para aves de corral, que son eficaces contra *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis* sp..

Se ha mostrado que el efecto de sustancias sobre protozoos se determina del modo más adecuado mediante la variación del recuento celular (véase por ejemplo Zenner y col., 2003; Caillait y col., 2002). Para ello se determina en primer lugar el número de protozoos presentes en un cultivo y eventualmente se ajusta a un número determinado. A continuación se cultiva el cultivo clonal en presencia de sustancias, que podrían alterar potencialmente el crecimiento de los protozoos. Tras un tiempo de incubación de al menos 12 horas, preferentemente al menos 24 horas, se determina de nuevo el número de protozoos y se compara con el número de partida o con un control negativo (medio de cultivo sin adición de inhibidores potenciales). Una disminución del recuento celular con respecto a la muestra de partida o un número reducido de protozoos con respecto a los controles negativos muestra que la sustancia tiene una influencia negativa sobre la especie de protozoo. El número de parásitos se determina de forma sencilla mediante determinación del recuento celular (por ejemplo tinción vivo-muerto).

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar una especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis* sp. en una muestra que comprende las etapas de:

- proporcionar una muestra,
- poner en contacto la muestra con al menos un oligonucleótido específico para *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* o *Blastocystis* sp. o un anticuerpo dirigido contra *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* o *Blastocystis* sp.,
- eventualmente someter la muestra/mezcla de oligonucleótidos a una técnica de amplificación de ácido nucleico,
- detectar un producto de amplificación de ácido nucleico, una unión de oligonucleótidos/células protozoarias o una unión de células protozoarias/anticuerpos.

La provisión de cultivos clonales de protozoo posibilita establecer agentes (por ejemplo anticuerpos) que pueden usarse para detectar protozoos de manera específica en una muestra. Preferentemente la muestra es una muestra de tejido, de heces, de cultivo o del entorno (por ejemplo una muestra de un gallinero o cercado de aves de corral).

Preferentemente se usan los oligonucleótidos 5-GAAAGCATCTATCAAGTGGAA-3' y 5'-GATCTTTTCAAATTAGCTTTAAA-3' para la determinación de *Histomonas meleagridis*, 5'-GCAATTGTTTCTCCAGAAGTG-3' y 5'-GATGGCTCTCTTTGAGCTTG-3' para la determinación de *Tetratrichomonas gallinarum*, 5'-TAACCGTAGTAATTCTAGGGC-3' y 5'-AACGTTAATATACGCTATTGG-3' para la determinación de *Blastocystis* sp..

Los oligonucleótidos pueden usarse tanto como cebador/par de cebadores para la amplificación de una sección del genoma por medio de por ejemplo PCR como también como sondas de hibridación.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un kit para la detección de *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis* sp. o anticuerpo dirigido contra una de estas células en una muestra que comprende:

a) células protozoarias clonales de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis* sp. o un anticuerpo dirigido contra células protozoarias de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis* sp. y

b) agentes para la detección de la unión de células protozoarias/anticuerpo.

El kit según la invención puede usarse para detectar *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis* sp. o también la presencia de anticuerpos contra estas células protozoarias en una muestra. La detección de anticuerpos en una muestra (se proporcionan células protozoarias y se incuban con una muestra) sirve por ejemplo para observar el transcurso de inmunización de un ave de corral o únicamente para determinar si el ave de corral ya presenta un título de anticuerpos suficientemente protector contra *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* o *Blastocystis* sp.

Preferentemente las células protozoarias clonales o los anticuerpos están inmovilizados en un soporte sólido.

Es ventajoso cuando o bien las células protozoarias o bien los anticuerpos contra estas células protozoarias están unidos sobre un soporte sólido.

Según una forma de realización preferida, los agentes para la detección son anticuerpos conjugados, preferentemente marcados, especialmente anticuerpos marcados con radioactividad, con enzimas o con fluorescencia.

El experto conoce suficientemente procedimientos para la detección de uniones de anticuerpo/ligando (véase por ejemplo "Immunochemical Protocols", 3ª edición (2005), ed. Burns, Robert, Humana Press).

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un alimento para animales o un aditivo de alimento para animales que comprende una formulación de vacuna según la invención.

- 5 Un alimento para animales, que lleva a la vacunación de aves de corral contra *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* o *Blastocystis sp.*, ha resultado ser especialmente ventajoso, dado que de esta manera puede planearse la vacunación de los animales de forma sencilla y eficaz.

La presente invención se describe adicionalmente mediante las siguientes figuras y ejemplos, sin limitarse sin embargo a los mismos.

- 10 La figura 1 muestra la representación al microscopio óptico (x 400; banda: 10 µm) del cultivo de partida A con *Histomonas meleagridis* (a), *Tetratrichomonas gallinarum* (b) y *Blastocystis sp* (c).

**La figura 2** muestra cultivos clonales de: *Histomonas meleagridis* (**A**); *Tetratrichomonas gallinarum* (**B**) y *Blastocystis sp.* (**C**) tras la micromanipulación.

- 15 La figura 3 muestra la especificidad de los ensayos de PCR desarrollados. En ninguna de las imágenes están reacciones cruzadas, aunque para este ensayo se usaron en cada caso extractos de ADN de 10<sup>5</sup> microorganismos de *Histomonas meleagridis* (Hm), *Tetratrichomonas gallinarum* (Tg) y *Blastocystis sp.* (B1). M: marcador de peso molecular (escala de 100-pb), 1: *Histomonas meleagridis*, 2: *Tetratrichomonas gallinarum* 3: *Blastocystis sp.*; N: Control negativo. Cebador usado: A: Hmf / Hmr (longitud del producto de PCR: 574 pb); B: Tgf / Tgr (527 pb), C: Blf / Blr (457 pb). Oligonucleótidos correspondientes a la tabla 4.

20 **Ejemplos:**

**Ejemplo 1:** Producción de cultivos clonales de *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*

El punto de partida para los trabajos fueron 2 cultivos mixtos (A y B), que se depositaron por las heces de pavos.

- 25 El primer cultivo procedía de un pavo de 10 semanas de edad, de una población con 5000 animales, de los cuales el 40 % murió y el resto se sacrificó (Hess y col., 2004). Aproximadamente 1 g de heces de intestino ciego junto con algo de mucosa se transfirieron a 9 ml de medio 199 + sales de Earle + L-glutamina + HEPES 25 mM + L – aminoácidos (Gibco™, Invitrogen). Adicionalmente se agregaron 11 mg de almidón de arroz (Sigma Aldrich), suero de ternero fetal al 10 % (Gibco™, Invitrogen), antibióticos (200 UI de penicilina y 200 µg de estreptomina por ml de medio) y un antimicótico (2,5 µg de anfotericina B/ml de medio). Este medio se usó en todos los ensayos posteriores
- 30 como medio patrón. Se realizaron pases cada segundo día, transfiriéndose 1 ml del medio a un nuevo tubo de 50 ml estéril (Sarstedt), que a su vez contenía 9 ml de medio patrón. En el pase 117 se usó el cultivo para la micromanipulación.

- 35 El cultivo original B se produjo de manera similar al cultivo A. No obstante se usó como material de partida material de intestino ciego de un pavo ocelado de una instalación de ocio, en la que 2 de 6 animales murieron. Para la micromanipulación se usó el cultivo B tras el pase 7.

- Para aislar células individuales a partir de los cultivos precursores A y B, se usó la micromanipulación, tal como ya se ha descrito para otros protozoos. De este modo Farri y col. (Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 72(2) (1978): 205-206) han usado este método para clonar *Entamoeba histolytica*. Odula y col. (Experimental Parasitology 66(1988): 86-95) usan el método para clonar el agente patógeno de la malaria, *Plasmodium falciparum*. Por último Bushek y col. (J. Eucaryotic Microbiol. 47(2000): 164-166) pudieron establecer cultivos clonales de microorganismo patógeno para ostras *Perkinsus marinus*.
- 40

Todos los trabajos usan la propiedad de la micromanipulación de que pueden manipularse células individuales y por lo tanto separarse.

La micromanipulación se realizó en concreto tal como sigue:

- 45 Los dos cultivos originales (A y B) de heces de pavos se diluyeron 1:100 y se cultivaron con un capilar (1,0 mm de diámetro externo, Hilgenberg, Alemania), que se había aplicado sobre un extracto (P97, Sutter, USA) y con un diámetro externo de 25 µm (Microforge deFonbrune, Bacher, Alemania). Los parásitos se llevaron a 50 µl de medio de cultivo y se transfirieron a un tubo Eppendorf. El desarrollo completo se realizó con un micromanipulador Narishige (Narishige, Japón) y un microscopio (Diaphot 300, Nikon, Austria) con un aumento de 400 veces.
- 50 Para la supervisión del asilamiento se usó una cámara CCD y un monitor (Sony, Japón), que está conectado con el microscopio. Tras el aislamiento se incubaron los microorganismos a 40 °C hasta 4 días en tubos Eppendorf. Se examinó con el microscopio óptico el crecimiento en el 2º, 3º y 4º día. Cada colonia positiva o sospechosa se transfirió a 9,7 ml de medio patrón en un tubo de plástico de 50 ml (Sarstedt).



Para el cultivo es decisivo el uso de un sustrato de crecimiento correspondiente (“medio de siembra”). Esto es necesario, dado que al menos *Histomonas meleagridis* no crece en ausencia de bacterias y una fuente de hidratos de carbono, especialmente almidón, tal como almidón de arroz, por lo tanto de manera axénica. Para producir un sustrato de crecimiento correspondiente se determinó la flora acompañante bacteriana del cultivo original respectivo.

5 Para este fin se aplicaron aproximadamente 100 µl de la colonia original sobre medios comerciales *Columbia* (+5% de sangre), *McConkey*, *Salmonella Detection and Identification Media* (SMID) y placas de agar Sabouraud (todas: bioMerieux, Marcy l’Etoile, Francia). La identificación de la flora bacteriana tuvo lugar con el microsistema API-20 E Microsystem (bio Merieux, Marcy l’Etoile, Francia). Como flora bacteriana acompañante principal se identificaron *E.coli*, estafilococos y estreptococos. Con una con asa de inoculación se quitó una parte de las bacterias de la placa de agar sangre Columbia y se añadió en el medio de cultivo antes de la micromanipulación.

Para realizar una identificación adicional de los agentes patógenos, se secuenciaron partes del ARN ribosómico y se introdujeron en el banco de datos de secuencias accesible al público (números de registro: AJ920322 - AJ920324).

**Ejemplo 2:** Determinación del comportamiento de crecimiento de los cultivos clonales.

15 Tras el aislamiento se mantuvieron los parásitos durante 3-4 días en cada caso en tubos Eppendorf, hasta que se transfirieron a un tubo de 50 ml, que contenía a su vez 9 ml de medio. A continuación, tras 3 - 4 días se transfirió 1 ml del cultivo a un tubo nuevo, en el que se habían depositado previamente 9 ml del medio patrón, por consiguiente un modo de proceder idéntico que en los cultivos originales A y B. El cultivo adicional tuvo lugar después de manera análoga al procedimiento de los cultivos de partida. En momentos distintos se realizaron recuentos para determinar la tasa de crecimiento de los organismos unicelulares. A este respecto se realizó por medio de azul tripano (al 0,4 %) una tinción vivo-muerto (tabla 1).

**Tabla 1.** Para examinar el comportamiento de crecimiento de los agentes patógenos clonados, se elaboró un perfil de crecimiento en diferentes momentos, tal como se representa en la siguiente tabla (1).

Organismo	Número de pases	*Día 0	#24 h	48 h	72 h	96 h
<i>Histomonas meleagridis</i>	62	1,0 x 10 <sup>4</sup>	2,75 x 10 <sup>5</sup>	3,30 x 10 <sup>5</sup>	7,45 x 10 <sup>5</sup>	3,25 x 10 <sup>5</sup>
<i>Tetratrichomonas gallinarum</i>	114	1,0 x 10 <sup>4</sup>	7,5 x 10 <sup>4</sup>	8,050 x 10 <sup>6</sup>	8,450 x 10 <sup>6</sup>	4,650 x 10 <sup>6</sup>
<i>Blastocystis sp.</i>	74	6,4 x 10 <sup>4</sup>	1,91 x 10 <sup>6</sup>	7,275 x 10 <sup>6</sup>	3,675 x 10 <sup>6</sup>	4,0 x 10 <sup>5</sup>
*Número de protozoos vivos en 1 ml de medio, que se transfirieron a 9 ml de medio reciente.						
"Número de protozoos/ml en diferentes momentos tras la incubación						

25 **Ejemplo 3:** Sensibilidad de los cultivos para la preparación patrón de dimetridazol, como referencia para las pruebas de sustancias *in vitro*.

Para someter a prueba la posibilidad de las pruebas de sustancias se mezcló el cultivo clonal de *Histomonas* con el derivado de imidazol dimetridazol.

30 En conjunto se centrifugaron tres tubos de 50 ml del cultivo clonado de *Histomonas* en el 3<sup>er</sup> día del cultivo a 380 x g. A continuación se quitó y se desechó el sobrenadante. Los sedimentos de los 3 tubos se reunieron y se recomentaron las histomonas. A continuación se ajustó por medio de medio de cultivo celular una concentración de 100.000/ml. En cada caso se transfirió 1 ml de cultivo de histomonas a un tubo Eppendorf y se incubó junto con 0,4 mg de dimetridazol a 40 °C. A espacios de 24 h se realizó un recuento de los parásitos, para examinar el efecto de una sustancia de prueba, tal como se representa en la tabla 2 a modo de ejemplo.

35 **Tabla 2:** Desarrollo del crecimiento del agente patógeno clonado *Histomonas meleagridis*, como modelo para las pruebas de sustancias *in vitro*

	<sup>a</sup> Momento 0	<sup>b</sup> 24 h	48 h
Adición de 0,4 mg de dimetridazol	100.000	c --	--
Control (sin adición)	100.000	570.000	605.000
<sup>a</sup> Número de protozoos vivos en 1 ml de medio			
<sup>b</sup> Número de protozoos/ml en distintos momentos tras la incubación			
<sup>c</sup> Ningún parásito vivo presente			

El ejemplo muestra claramente la eficacia del principio activo dimetridazol.

**Ejemplo 4:** Reproducción de la histomoniasis o enfermedad de la cabeza negra en pavos de 14 días de edad, como base para la estabilización de un modelo *in vivo*, adecuado para las pruebas de sustancias *in vivo*.

Para examinar la infecciosidad de los cultivos, se realizó un ensayo en animales, infectándose por vía intracloacal pavos de 14 días de edad.

5 Se apartaron pavos comerciales (18 animales) como polluelos de un día de edad y se les proporcionó alimento convencional. A la edad de 14 días se dividieron los 18 animales de tal manera que 14 animales permanecieron en un espacio y 4 animales se pasaron a otro espacio. De los 14 animales se infectaron 10 animales por la cloaca con 200.000 histomonas en cada caso (número de pases: 7x hasta la clonación; 7x tras la clonación). Los animales se examinaron clínicamente a diario y se anotaron todas las anomalías (especialmente diarreas). La tabla 2 proporciona una visión general del transcurso de la enfermedad en los animales infectados y los animales en contacto.

10 **Tabla 3:** Casos de diarrea y transcurso de la enfermedad de la histomoniasis en pavos de 14 días de edad.

Día/ Animal	Animales control				Animales infectados										Animales en contacto				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
6	- <sup>a</sup>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
7	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	X	-	-	-	X	-	-	-	-	
9	-	-	-	-	X <sub>b</sub>	-	-	X	X	X	-	-	X	-	-	-	-	-	
10	-	-	-	-	X	X	X	-	X	X	X	-	X	-	-	X	-	X	
11	-	-	-	-	† <sub>c</sub>	†	X	†	†	†	X	†	†	-	-	X	†	-	
12	-	-	-	-			†				X			†	X	X		-	
13	-	-	-	-							†				†	-		X	
14	Animales muertos															†			†

<sup>a</sup> -: sin diarrea  
<sup>b</sup> X: diarrea de color azafrán típico  
<sup>c</sup> †: animal muerto

El hecho de que todos los animales (animales infectados y animales en contacto) mueran entre el 11º y 14º día tras la infección, subraya la eficacia del modelo en animales establecido.

**Ejemplo 5:** Establecimiento de métodos de diagnóstico moleculares para la detección específica de *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*

15 Los cultivos clonales se usaron para establecer métodos de detección moleculares, con la propiedad de detectar el agente patógeno respectivo.

Para este fin se construyeron oligonucleótidos con cuya ayuda puede detectarse específicamente el agente patógeno respectivo.

20 Basándose en las diferencias genómicas en la región del ARN ribosómico se construyeron oligonucleótidos que posibilitan la detección específica del agente patógeno respectivo por medio de hibridación o amplificación del fragmento de genoma (PCR).

**Tabla 4:** Oligonucleótidos para la detección específica de *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*

Cebador	Secuencia	Posición de nucleótido <sup>a,b,c</sup>	Amplificado
Hmf	5'- GAA AGC ATC TAT CAA GTG GAA -3'	768 - 788 pb <sup>a</sup>	574 pb
Hmr	5'-GAT CTT TTC AAA TTA GCT TTA AA-3'	1342 - 1320 pb <sup>a</sup>	
Tgf	5'-GCA ATT GTT TCT CCA GAA GTG-3'	152 - 171 pb <sup>b</sup>	527 pb
Tgr	5'-GAT GGC TCT CTT TGA GCT TG-3'	660 - 679 pb <sup>b</sup>	
Blf	5'-TAA CCG TAG TAA TTC TAG GGC-3'	120 - 140 pb <sup>c</sup>	457 pb
Blr	5'- AAC GTT AAT ATA CGC TAT TGG -3'	557 - 577 pb <sup>c</sup>	

<sup>a</sup>: según el número de registro: AF293056  
<sup>b</sup>: según el número de registro: AF124608  
<sup>c</sup>: según el número de registro: AF408427

**Bibliografía:**

- Allen, E.A., (1941) *Am. J. Vet. Res.*, 2:214-217.
- Bayon y Bishop, (1937) *Nature*, 139:370-371.
- 5 Bishop A. (1938) *Parasitology*, 30: 181-194.
- Burkot, T.R., y col. (1984) *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78:339-341.
- Callait, M.P., y col. (2002) *Poult Sci.* 81:1122-7.
- Cepicka, I., y col. (2005) *Vet. Parasitol.* 128:11-21.
- Dwyer, D.M., (1970) *J. Parasitol.* 56:191-192.
- 10 Esquenet, C., y col. (2003) *Avian Pathol.* 32:303-306.
- Gerbod, D., y col. (2001) *J. Eukaryot. Microbiol.* 48:498-504.
- Goedbloed y Bool, (1962) *Avian Dis.*, 6:302-315.
- Hafez, H. M., y col. (2001) *Tierärztl. Praxis* 3:168.
- Hess, M., y col. (2004) 5th International Symposium on Turkey Diseases, Berlín, 16.-19.06.2004, 254-257.
- 15 Hu, J., y col. (2004) *Avian Dis.* 48:746-750. Hu, J.H., McDougald, L.R., (2003) *Avian Dis.* 47:489-492.
- Kemp, R.L., Reid, W.M., (1966) *Avian Dis.* 10:357-363.
- Kulda y col. (1974) *Acta Vet. Brno*, 43:53-64.
- Landmann, W.J.M., y col. (2004) 5th International Symposium on Turkey Diseases, Berlín, 16.-19.06.2004, 258-268.
- 20 LeBras, J., y col. (1983) *Exp. Parasitol.* 56:9-14.
- McDougald, L.R., Galloway, R.B., (1973) *Avian Dis.* 17:847-850.
- McDougald, L.R., (2003). Other protozoan diseases of the intestinal tract - Histomoniasis (Blackhead). En Saif, Y.M., Barnes, H.J., Glisson, J.R., Fadly, A.M., McDougald, L.R., Swayne, D.E., (Ed.), *Diseases of Poultry*, Iowa State Press, Ames, Iowa p 1001-1008.
- 25 Noel, C., y col. (2003) *Mol. Biochem. Parasitol.* 126:119-123.
- Noel, C., y col. (2005) *J. Clin. Microbiol.* 43:348-355.
- Norton y col. (1999) *Avian Diseases*, 43:342-348.
- Rosario, V., (1981) *Science* 212:1037-1038.
- Smith, T., (1895). An infectious disease among turkeys caused by Protozoa (infectious enterohepatitis). US
- 30 Dept. Agric. Bur. Anim. Indust., Bull. No. 8, 7.
- Stepkowski, S., Klimont, S., (1979). Obserwacje nad hodowlą in vitro *Histomonas meleagridis* (Smith, 1895), *Med. Wet.* 8:502-505.
- Trager, W., y col. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78:6527-6530.
- Tyzzer, E.E., (1920) *J. Parasitol.* 6:124-130.
- 35 Zenner, L., y col. (2003) *Parasite.* 10:153-7.

## REIVINDICACIONES

1. Cultivo clonal de protozoos que comprende células protozoarias de una única especie de protozoo, seleccionándose la especie de protozoo del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*, **caracterizado porque** el cultivo contiene bacterias simbióticas o su lisado.
- 5 2. Cultivo de protozoos según la reivindicación 1, **caracterizado porque** las bacterias son enterobacterias, especialmente bacterias coliformes, estafilococos, estreptococos o mezclas de los mismos.
3. Formulación de vacuna que comprende células protozoarias clonales vivas o inactivadas de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* o un anticuerpo dirigido contra células protozoarias clonales de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*
- 10 4. Formulación de vacuna según la reivindicación 3, **caracterizada porque** la vacuna comprende un adyuvante, que se selecciona preferentemente del grupo constituido por adyuvante completo de Freund, adyuvante incompleto de Freund, hidróxido de aluminio, *Bordetella pertussis*, saponina, muramil dipéptido, copolímero de etileno-acetato de vinilo, aceite, preferentemente un aceite vegetal o un aceite mineral, especialmente aceite de cacahuete o aceite de silicona, y combinaciones de los mismos.
- 15 5. Formulación de vacuna según la reivindicación 3 ó 4, **caracterizada porque** las células protozoarias clonales están inactivadas mediante pase, mediante radiación, especialmente mediante radiación UV y radioactiva, mediante sustancias químicas o mediante virus o mediante calor, formalina, beta-propiolactona o combinaciones de los mismos.
- 20 6. Formulación de vacuna según una de las reivindicaciones 3 a 5, **caracterizada porque** la vacuna está adaptada para la administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, oral o intraoculal.
7. Procedimiento para la producción de un cultivo clonal de protozoos que comprende células protozoarias de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* que comprende las etapas de:
- 25 a) proporcionar una muestra de partida que comprende células protozoarias de al menos una especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*,
- b) cultivar las células de la muestra de partida en un medio de cultivo que comprende una fuente de hidratos de carbono y bacterias de al menos una especie de bacteria, que viven *in situ* de forma simbiótica con las células protozoarias, o lisados de las mismas,
- 30 c) individualizar las células protozoarias por medio de micromanipulación,
- d) cultivar las células protozoarias individualizadas en un medio de cultivo tal como se define en b) y
- e) eventualmente determinar la pureza del cultivo clonal de protozoos.
- 35 8. Procedimiento según la reivindicación 7, **caracterizado porque** la muestra de partida es una muestra de heces, de tejido, de cultivo o del entorno.
9. Procedimiento según la reivindicación 7 u 8, **caracterizado porque** la muestra de partida se proporciona por un ave de corral seleccionada del grupo constituido por pavo, gallina, faisán, pavo real, codorniz y gallina de guinea.
- 40 10. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 9, **caracterizado porque** la fuente de hidratos de carbono es almidón, especialmente almidón de arroz, de maíz o de patata.
11. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 10, **caracterizado porque** las bacterias son enterobacterias, especialmente bacterias coliformes, estafilococos, estreptococos o mezclas de los mismos.
12. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 11, **caracterizado porque** el medio de cultivo contiene además sales, especialmente sales de Earle, aminoácidos, especialmente L-glutamina, y antibióticos/antimicóticos, especialmente penicilina, estreptomina y anfotericina.
- 45 13. Procedimiento según una de las reivindicaciones 7 a 12, **caracterizado porque** la pureza del cultivo se determina por medio de una técnica de amplificación de ácido nucleico o técnica de hibridación o por medio de una técnica inmunológica con anticuerpos dirigidos contra células protozoarias clonales de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.*
- 50 14. Procedimiento según la reivindicación 13, **caracterizado porque** se usan los oligonucleótidos 5'-GAAAGCATCTATCAAGTGGAA-3' y 5'-GATCTTTTCAAATTAGCTTTAAA-3' para la determinación de *Histomonas meleagridis*, 5'-GCAATTGTTTCTCCAGAAGTG-3' y 5'-GATGGCTCTCTTTGAGCTTG-3' para la determinación de *Tetratrichomonas gallinarum*, 5'-TAACCGTAGTAATTCTAGGGC-3' y 5'-AACGTTAATATACGCTATTGG-3' para la

determinación de *Blastocystis sp.*

15. Procedimiento para la determinación de la influencia de sustancias o mezclas de sustancias sobre células protozoarias de una especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* que comprende las etapas de:

- 5
- proporcionar un cultivo clonal de protozoos según la reivindicación 1 ó 2,
  - eventualmente ajustar el recuento de células del cultivo de protozoos,
  - poner en contacto y cultivar el cultivo clonal de protozoos con un medio de cultivo tal como se define en las reivindicaciones 7 y 10 a 12,
- 10
- añadir al menos una sustancia o al menos una mezcla de sustancias, que puede ejercer potencialmente una influencia sobre células protozoarias,
  - determinar el recuento de células protozoarias en el cultivo de protozoos,
  - comparar el recuento de células protozoarias antes y después de la adición de la al menos una sustancia o de la al menos una mezcla de sustancias.

15 16. Procedimiento para detectar una especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* en una muestra que comprende las etapas de:

- 20
- proporcionar una muestra,
  - poner en contacto la muestra con al menos un oligonucleótido específico para *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* o *Blastocystis sp.* o un anticuerpo dirigido contra *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* o *Blastocystis sp.*,
  - eventualmente someter la muestra/mezcla de oligonucleótidos a una técnica de amplificación de ácido nucleico,
- 25
- detectar un producto de amplificación de ácido nucleico, una unión de oligonucleótido/células protozoarias o una unión de células protozoarias/anticuerpo.

17. Procedimiento según la reivindicación 16, **caracterizado porque** se usan los oligonucleótidos 5'-GAAAGCATCTATCAAGTGGAA-3' y 5'-GATCTTTTCAAATTAGCTTTAAA-3' para la determinación de *Histomonas meleagridis*, 5'-GCAATTGTTTCTCCAGAAGTG-3' y 5'-GATGGCTCTCTTTGAGCTTG-3' para la determinación de *Tetratrichomonas gallinarum*, 5'-TAACCGTAGTAATTCTAGGGC-3' y 5'-AACGTTAATATACGCTATTGG-3' para la determinación de *Blastocystis sp.*

18. Kit para la detección de *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* o anticuerpo dirigido contra una de estas células en una muestra que comprende:

- 35
- a) células protozoarias clonales de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* o un anticuerpo dirigido contra células protozoarias de una única especie de protozoo seleccionada del grupo constituido por *Histomonas meleagridis*, *Tetratrichomonas gallinarum* y *Blastocystis sp.* y
  - b) agentes para la detección de la unión de células protozoarias/anticuerpo.

19. Alimento para animales o aditivo de alimento para animales que comprende una vacuna según una de las reivindicaciones 3 a 6.

40

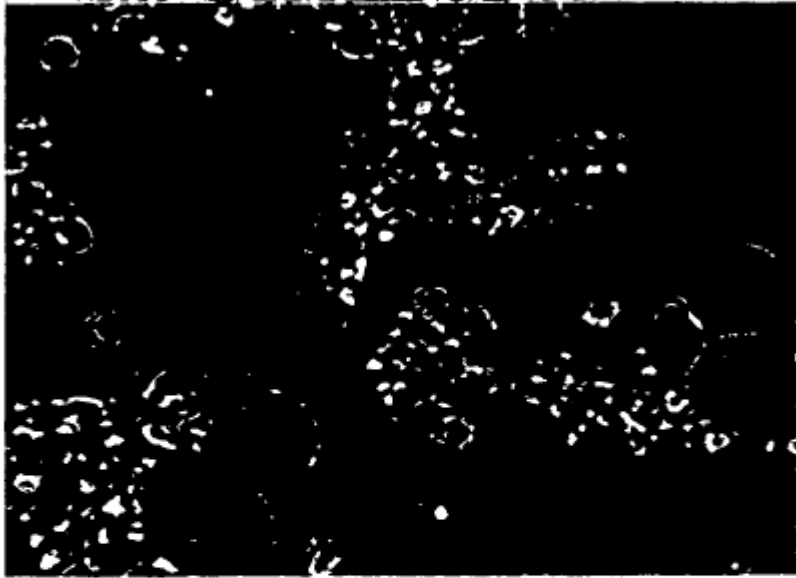


Fig. 1

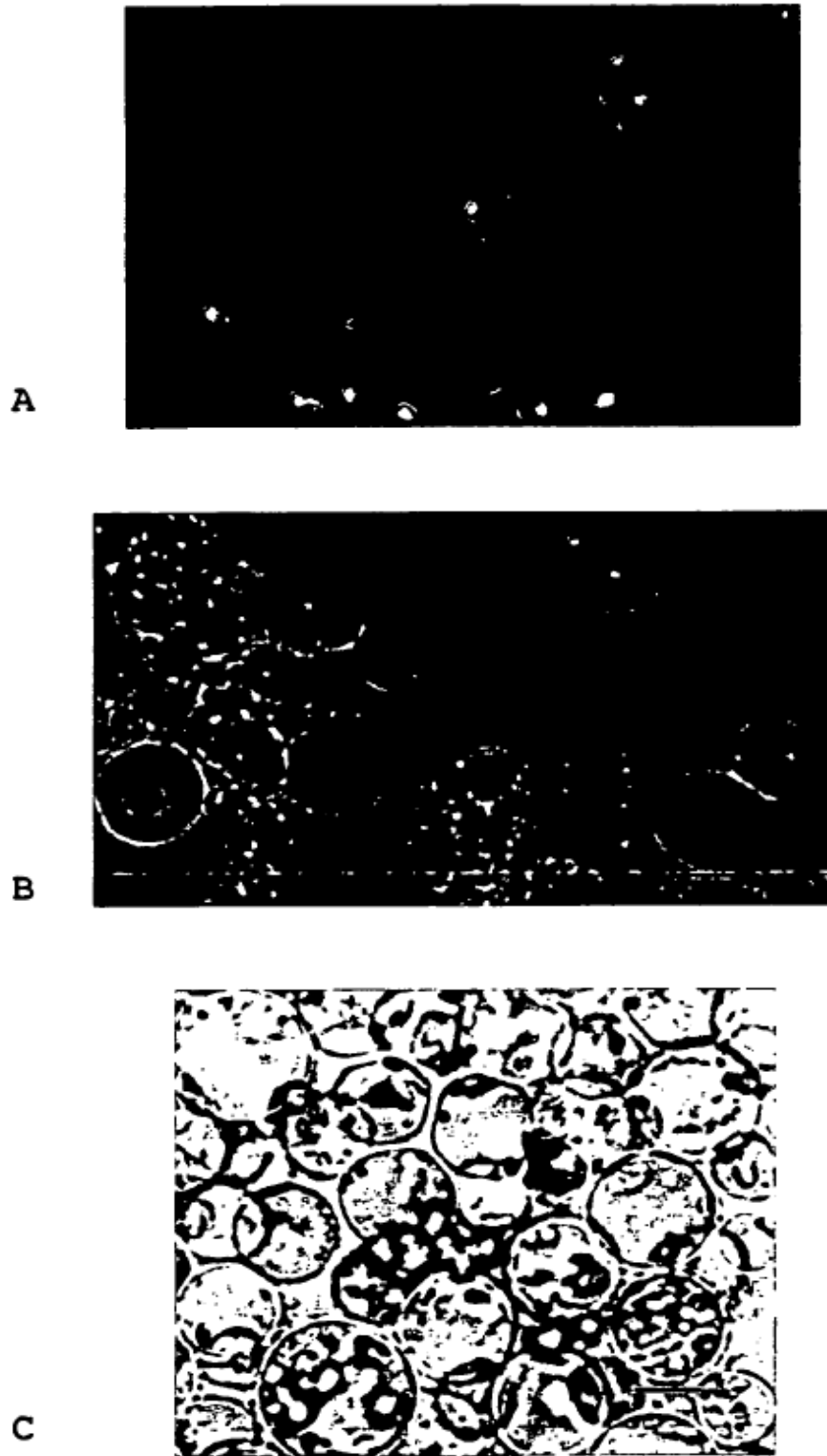


Fig. 2

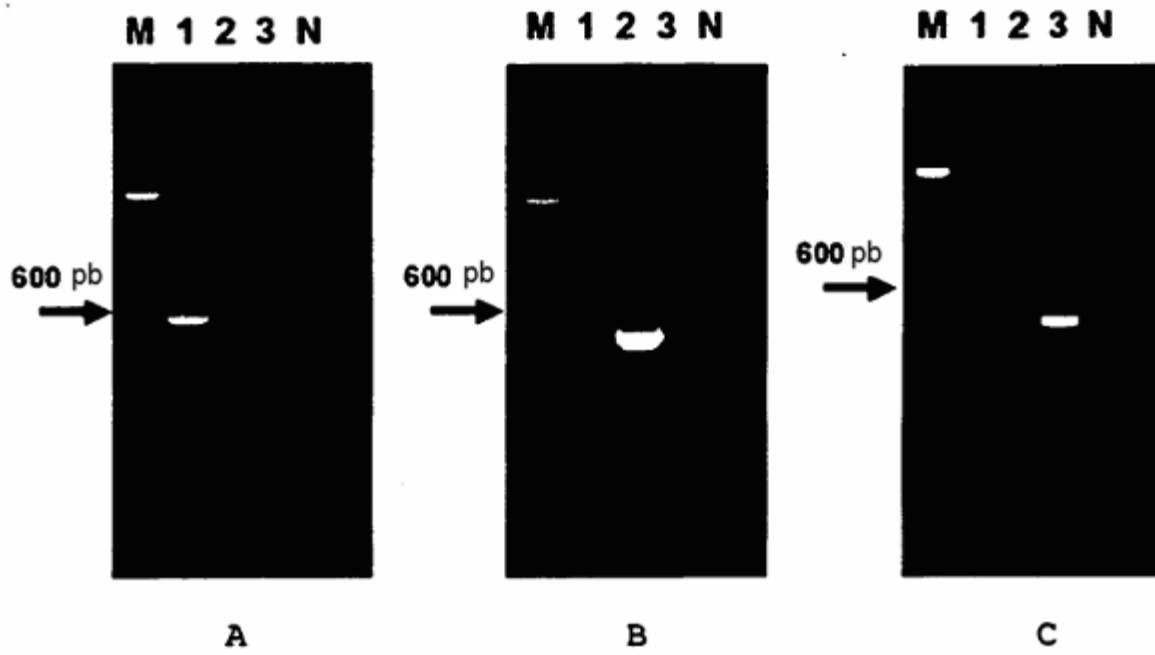


Fig. 3