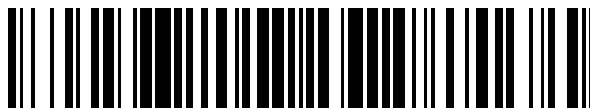


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 425**

21 Número de solicitud: 201430556

51 Int. Cl.:

C07K 16/14 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

15.04.2014

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.10.2015

71 Solicitantes:

FUNDACIÓN UNIVERSITARIA SAN PABLO - CEU
(80.0%)

C/ Isaac Peral, 58
28040 Madrid ES y
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA DE LA JUNTA
DE CASTILLA LA MANCHA (20.0%)

72 Inventor/es:

DEL ÁGUILA DE LA PUENTE, Carmen;
IZQUIERDO ARIAS, Fernando;
FERNÁNDEZ VADILLO, Carmen;
FENOY RODRÍGUEZ, Soledad;
HIGES PASCUAL, Mariano y
MARTÍN HERNÁNDEZ, Raquel

74 Agente/Representante:

FUENTES PALANCAR, José Julian

54 Título: **Anticuerpo monoclonal 9G2 específico anti-exospora Nosema apis para el diagnóstico mediante técnicas inmunoquímicas de las nosemosis de la abeja**

57 Resumen:

Anticuerpo monoclonal 9G2 específico anti-exospora, seleccionado y caracterizado por su capacidad de reconocer epítomos presentes en la exospora de microsporidios de la especie *Nosema apis*, con el fin de ser utilizado en el diagnóstico diferencial mediante técnicas inmunoquímicas, en particular la de inmunofluorescencia indirecta (IFI), en el diagnóstico de las nosemosis de la abeja causada por *Nosema apis*, también conocida como nosemosis o diarrea de la abeja. AcMc 9G2 puede ser aplicado, solo o en combinación con otros agentes, en la preparación de composiciones y en sistemas de detección comerciales para el diagnóstico de dicha enfermedad de las abejas.

ES 2 548 425 A1

DESCRIPCION

Anticuerpo monoclonal 9G2 específico anti-exospora *Nosema apis* para el diagnóstico mediante técnicas inmunoquímicas de las nosemosis de la abeja.-

5

El objeto de la presente invención es el anticuerpo monoclonal (AcMc) 9G2 específico anti-exospora, para ser utilizado mediante técnicas inmunoquímicas, en particular la de inmunofluorescencia indirecta (IFI), en el diagnóstico de las nosemosis de la abeja causada por *Nosema apis*, también conocida como nosemosis o diarrea de la abeja.

10

El desarrollo de este AcMc específico anti-exospora frente a la especie de microsporidio objeto de estudio, *Nosema apis*, para su uso mediante técnicas inmunoquímicas, se presenta como una buena alternativa con respecto a las actuales técnicas basadas en marcadores moleculares, como PCR y Multiplex PCR, muy laboriosas y costosas, ya que ofrece la misma eficacia en la detección y diferenciación de las esporas de las dos especies de microsporidios del género *Nosema* relacionadas con dicha patología de las abejas, *Nosema Apis*, propia de la abeja europea *Apis mellifera*, y *Nosema cerenae*, propia de la abeja asiática *Apis cerenae*.

15

20 CAMPO TÉCNICO.-

El campo técnico de la invención es el de las Inmunoglobulinas, dentro de los anticuerpos monoclonales frente a patógenos parásitos, y en particular, el de investigación y desarrollo de anticuerpos monoclonales para su utilización mediante técnicas inmunoquímicas contra los microsporidios más frecuentes de las abejas.

25

ESTADO DE LA TÉCNICA.-

La importancia económica de la industria apícola es indiscutible ya que, las abejas son insectos polinizadores que cumplen un papel muy importante en la naturaleza. El proceso de polinización es crítico en la producción de alimentos y por lo tanto, para la continuación del modo de subsistencia humana. Es más, la polinización es un proceso que une directamente los ecosistemas naturales con los sistemas de producción agrícola (FAO, 2008; Gisder y col., 2010; Klein y col., 2007). El papel de estos insectos ha hecho que, en la actualidad, exista un elevado interés por la reciente disminución de polinizadores detectada en distintas regiones del mundo (FAO, 2008; Williams, 2005).

30

35

En los últimos años, se ha observado una elevada mortalidad en las abejas de diferentes zonas geográficas y en consecuencia una reducción en la producción de miel (Chauzat y col., 2004; Faucon, 2005). Los análisis realizados sobre estas abejas han mostrado un incremento en los casos diagnosticados de nosemosis. La nosemosis es una patología descrita en las abejas productoras de miel producida por organismos intracelulares, concretamente, microsporidios pertenecientes al género *Nosema*. Existen dos especies pertenecientes a este género relacionadas con esta patología: *Nosema apis* parásito de las abejas occidentales y europeas, *Apis mellifera*, y *Nosema ceranae* parásito de la abeja asiática *Apis ceranae*. Sin embargo, el hecho de que en los últimos años, en las diferentes zonas apícolas, tanto en nuestro país como en otras regiones geográficas, se haya detectado un aumento de las infecciones por *N. ceranae* en la abeja occidental y europea *A. mellifera*, lo que ha provocado una patología mucho más agresiva a las abejas productoras de miel, hace necesaria la diferenciación de las dos especies (Faucon, 2005; Higes y col., 2004; Higes y col., 2005; Martín y col., 2005).

La patología producida por *N. apis* es más fácilmente detectable en las colonias. Se caracteriza por la presencia de desórdenes digestivos en los adultos (diarrea) unidos a una elevada mortalidad. En el caso de *N. ceranae* la sintomatología es más difícil de detectar, consistiendo, inicialmente en un descenso en el crecimiento de la colonia. Esta patología se encuentra incluida dentro de las posibles causantes del Síndrome de Despoblamiento de las Colmenas (Higes y col., 2008; Higes y col., 2006; Higes y col., 2004; Higes y col., 2005). En ambos casos, las esporas se diseminan a través de las heces y del polen siendo solo los adultos susceptibles y no exhibiendo de forma individual ningún signo externo de infección. Ello hace que la identificación rápida a nivel de especie sea un objetivo prioritario para los apicultores.

La diferenciación entre las esporas de *N. ceranae* y las de *N. apis* mediante microscopía óptica resulta bastante complicada, ya que las esporas de las dos especies de *Nosema* son muy similares y difícilmente diferenciables. Aunque las esporas de *N. ceranae* son de un tamaño ligeramente menor (4,7 x 2,7 µm) que las de *N. apis* (6 x 3 µm) (Fries y col., 1996), si se comparan los rangos de tamaño que se han descrito para las esporas de ambas especies, existe un pequeño solapamiento, por lo que las esporas más pequeñas de *N. apis* podrían confundirse con las más grandes de *N. ceranae*. Otra característica que se puede tener en cuenta a la hora de diferenciar estas especies mediante microscopía óptica es que las esporas de *N. ceranae*, en algunos casos, se presentan ligeramente dobladas, lo que les proporciona una apariencia menos consistente que las de *N. apis* (Fries y col., 2006).

Para una mejor diferenciación entre las infecciones de las dos especies, se aconseja la utilización de cortes histológicos en los que se puede apreciar cómo se distribuyen éstas en las células del ventrículo recién infectado. Es típico de las infecciones por *N. apis* que las células epiteliales de *A. mellifera* en las que se encuentran las esporas maduras estén rodeadas de células vegetativas (merozoitos) del parásito. Probablemente esto sea el resultado de la germinación intracelular de las esporas y la subsiguiente transmisión horizontal entre células epiteliales vecinas (Fries, 1989). Las infecciones por *N. ceranae* en su hospedador original *A. cerana*, se presentan como focos aislados, de una sola célula epitelial en cuyo interior también se encuentran las esporas maduras que se han desarrollado. Esto, y el hecho de que no se encuentren esporas vacías en las células infectadas, hace pensar que esta especie no ha desarrollado la capacidad de transmisión horizontal entre células (Fries y col., 1996). Sin embargo, cuando *N. ceranae* infecta *A. mellifera*, presenta un patrón similar al de *N. apis* en éste hospedador, lo que descarta la histología como una técnica que permita el diagnóstico diferencial de las dos especies (Higes y col., 2007).

Las mayores diferencias entre las dos especies de *Nosema* aparecen al estudiar la ultraestructura de sus esporas. El túbulo polar en *N. apis* es de mayor tamaño, con 26-32 vueltas (Fries, 1989) que el de *N. ceranae* que sólo presenta 20-23 (Fries y col., 1996).

En ausencia de unas características morfológicas externas claras que permitan el reconocimiento de las dos especies utilizando el microscopio óptico de campo claro, ha hecho que se desarrollen otras técnicas, como las técnicas de biología molecular, basadas en marcadores moleculares, como PCR y *Multiplex* PCR (Martin-Hernandez y col., 2007) altamente sensibles que permiten la detección y diferenciación en paralelo de ambas especies.

La técnica de PCR, al ser de gran sensibilidad permite la detección de niveles muy bajos de infección producida por el parásito en todos los estados del ciclo (Weiss Vossbrinck, 1999) y la secuenciación de sus productos permite la identificación y diferenciación de las dos especies de *Nosema* (Higes y col., 2006). Un marcador que se ha utilizado para el diagnóstico de microporidiosis es la subunidad pequeña (SSU) del ARN ribosomal (16S rRNA). En estos parásitos, las secuencias de los genes de la 16S rARN son más cortas y no comparten apenas homologías con las de otros eucariotas. Además, son secuencias altamente conservadas. Muchas de estas secuencias se encuentran disponibles en la base de datos del *Gene Bank*. Klee y col. han desarrollado un método basado en el análisis de

polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP-PCR) de la SSU rRNA con el que se puede distinguir entre *N. apis* y *N. ceranae* (Klee y col., 2007). Martín-Hernández y col. a su vez han diseñado una PCR doble o múltiple que permite el diagnóstico simultáneo de las dos especies en la misma reacción (Martin-Hernandez y col., 2007). Chen y col. han ido más lejos poniendo a punto una PCR múltiple y a la vez cuantitativa en tiempo real (Q-PCR) lo que no sólo permite la detección simultánea de las dos especies sino la cuantificación de las mismas (Chen y col., 2009).

Sin embargo, estas técnicas de biología molecular no están exentas de complicaciones, al resultar laboriosas, con un gran número de horas necesarias para su desarrollo, y suponer un coste elevado, por requerir equipamiento y reactivos caros. Por todo ello, resulta de especial interés la búsqueda de una alternativa más económica y menos laboriosa, pero de igual eficacia que las técnicas moleculares, para la diferenciación a nivel de especie. En este sentido, el desarrollo de anticuerpos monoclonales (AcMc) frente a la especie objeto de nuestro estudio, *N. apis*, para su uso en la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se presenta como una buena alternativa.

El desarrollo de AcMc permite obtener clones de células híbridas o hibridomas que producen, de forma continua e ilimitada, anticuerpos “monoespecíficos” de actividad biológica conocida y especificidad constante (KöhlerMilstein, 1975).

En lo que se refiere al parásito en estudio *N.apis*, el desarrollo de anticuerpos monoclonales constituye en la actualidad una novedad. Si bien diferentes autores describen en sus trabajos la obtención de AcMc en otras especies de *Nosema* como *N. bombycis*, microsporidio parásito del gusano de seda (Li y col., 2009; Shamim y col., 1997; Zhang y col., 2007) , *N. locustae* parásito de saltamontes (Keohane y col., 2001; KnoblettYoussef, 1996) u otros microsporidios más frecuentes en el hombre como *E. bieneusi* (Accoceberry y col., 1999; Achbarou y col., 1999; Sheoran y col., 2005; Zhang y col., 2005), *E. cuniculi* (Enriquez y col., 1997; Furuya y col., 2008a; Furuya y col., 2008b; MoDrancourt, 2004), *E. hellem* (Aldras y col., 1994; Lujan y col., 1998; MoDrancourt, 2002; Visvesvara y col., 1994) o *E. intestinalis* (Beckers y col., 1996; del Águila y col., 2010), hasta la fecha no se conocen el desarrollos de AcMc específicos frente a las dos especies causantes de la nosemosis de la abeja, *N.ceranae* y *N. apis*.

Tampoco se han encontrado patentes relativas a la aplicación de técnicas inmunoquímicas de diagnóstico utilizando AcMc específicos para el diagnóstico de las nosemosis de la abeja.

Existen patentes sobre la aplicación de otras técnicas de diagnóstico de las nosemosis de otros insectos o animales, como por ejemplo las patentes chinas con número de publicación CN1470872-A, por "Método para la detección de nosemosis en *Bombix mori* y otros insectos, y su kit", y CN1428437-A, por "Método de detección de nosemosis en gusanos de seda por hibridización molecular de ácidos nucleicos", pero no para el caso de las abejas.

Por consiguiente, el objeto de la presente invención que a continuación se describe en detalle, es la obtención y caracterización de un anticuerpo monoclonal específico anti-exospora para ser utilizado en el diagnóstico mediante IFI u otras técnicas inmunoquímicas de las nosemosis de la abeja causada por *Nosema apis*, es decir, un AcMc que permita la diferenciación a nivel de especie de este microsporidio del género *Nosema* utilizando un microscopio óptico con fluorescencia.

LA INVENCION.-

El referido anticuerpo monoclonal específico reivindicado de invención es AcMc 9G2, obtenido y caracterizado por su capacidad de reconocer epítomos presentes en la exospora de microsporidios de la especie *Nosema apis*, con el fin de ser utilizado en el diagnóstico y caracterización mediante IFI u otras técnicas inmunoquímicas de las nosemosis de la abeja causada por dicha especie de microsporidios, también conocida como nosemosis o diarrea de la abeja.

El AcMc 9G2 ha sido producido por el hibridoma de ratón de la cepa BALB/c, que es la cepa de referencia y la más empleada para la obtención de anticuerpos monoclonales.

Los resultados obtenidos de reactividad y especificidad del AcMc específico 9G2 anti-exospora producido por el hibridoma seleccionado frente a antígenos o epítomos de *N. apis*, así como los resultados de evaluación de reacciones cruzadas de este anticuerpo monoclonal frente a *N. ceranae* y otras especies de microsporidios, avalan su utilización en muestras procedentes de colmenas para el diagnóstico diferencial de las dos especies utilizando la técnica de IFI. Los distintos patrones de reconocimiento del AcMc 9G2 frente a ambas especies de *Nosema* resultantes de su caracterización mediante Western-Blot confirman su uso para el diagnóstico diferencial de las mismas utilizando dicha técnica.

Estos resultados obtenidos con el AcMc 9G2 constituyen la base para su utilización, solo o en combinación con otros agentes, en la preparación de composiciones y sistemas de

detección de carácter comercial para el diagnóstico diferencial mediante técnicas inmunoquímicas de las de las nosemosis de la abeja causada por *Nosema apis*.

Las composiciones comerciales para el diagnóstico de la referida enfermedad de la abeja serán composiciones farmacéuticas o veterinarias cuyo agente o principio reactivo sea el AcMc 9G2 específico anti-exospora, utilizables mediante técnicas inmunoquímicas, como pueden ser inmunofluorescencia, tanto indirecta (IFI) como directa (IFD), técnicas inmunoenzimáticas, como ELISA o inmunoelectrotransferencia (Western-Blot), cultivos celulares "in vitro", o microscopía electrónica de transmisión (MET).

Las tres figuras incluidas al final de la presente memoria, cuyos resultados se comentan en el apartado de forma de realización de la invención, muestran diferentes aspectos del proceso de obtención y posterior caracterización del AcMc 9G2 frente a esporas de *N. apis* y *N. ceranae* para el fin al que este anticuerpo monoclonal se destina, que es el servir de base para la preparación de composiciones y sistemas de detección y diagnóstico diferencial de las nosemosis de la abeja causada por dicha primera especie de microsporidios, *Nosema apis*.

La **Figura 1** esquematiza el protocolo de inmunización en la obtención del AcMc 9G2.

La **Figura 2** muestra los resultados de reactividad del AcMc 9G2 mediante la técnica de IFI frente a esporas de *N.apis* (flechas de la izquierda) y *N. ceranae* (flechas de la derecha).

La **Figura 3** muestra el patrón de reconocimiento antigénico mediante Western-Blot (SDS-PAGE al 12%) utilizando el AcMc 9G2 frente a extracto de espora completa de **A:** *N. apis* y **B:** *N. ceranae*, siendo Calle 1: extracto de espora completa, y M: marcador de peso molecular.

FORMA DE REALIZACION.-

En la obtención del anticuerpo monoclonal específico en cuestión, los protocolos de inmunización se llevaron a cabo en ratones de la cepa BALB/c. Esta cepa se caracteriza por presentar una elevada histocompatibilidad con la línea de mieloma o plasmacitoma (P3X63-Ag.8.653) ya que deriva de la misma cepa animal, favoreciendo la estabilidad de los híbridos obtenidos en las fusiones celulares, de ahí que sea la más empleada para la obtención de anticuerpos monoclonales.

Los protocolos de inmunización y sangrías se llevaron a cabo en el Animalario de la facultad de Farmacia de la Universidad San Pablo-CEU (nº de registro CEE ES280220000015) y siguiendo las normas establecidas por el Real Decreto 233/1988 del 14 de marzo que transcribe la Directiva del Consejo 86/609 CEE.

5

Los lotes de ratones estaban constituidos por 10 ratones hembra de la cepa BALB/c de 7 semanas que fueron inmunizados mediante la administración intraperitoneal de 5×10^7 ó $2,5 \times 10^7$ esporas purificadas de *Nosema sp.* diluidas en un volumen final de 0,2 ml de PBS por ratón.

10

Los ratones se inmunizaron durante un total de 182 días, según se muestra en la **Figura 1**, que incluyeron los días de inoculación (hasta día 152 inclusive) y los de sangría (hasta día 182 inclusive). Se muestra, a continuación, la pauta de inoculaciones:

15 Inóculos:

- Día 1: se inoculó por vía intraperitoneal 5×10^7 esporas purificadas de *Nosema sp.* en 0,2 ml de volumen final por ratón.

20

- Día 12: se inoculó por vía intraperitoneal 5×10^7 esporas purificadas de *Nosema sp.* en 0,2 ml de volumen final por ratón.

- Día 97: se inoculó por vía intraperitoneal 5×10^7 esporas purificadas de *Nosema sp.* en 0,2 ml de volumen final por ratón.

25

- Día 121: se inoculó por vía intraperitoneal $2,5 \times 10^7$ esporas purificadas de *Nosema sp.* en 0,2 ml de volumen final por ratón

- Día 152: se inoculó por vía intraperitoneal $2,5 \times 10^7$ esporas purificadas de *Nosema sp.* en 0,2 ml de volumen final por ratón.

30

Durante este tiempo se estudiaron la evolución y tasa de anticuerpos producidos por los ratones tras la inmunización frente a las esporas de *Nosema sp.* Para ello se obtuvieron los sueros mediante la extracción de sangre por vía safena (Microvette R Cat. 16440, CB 300, Sarstedt), obteniéndose un volumen de 0,1 a 0,4 ml de sangre por ratón, tal y como reflejan las sangrías de la **Figura 1**. Los sueros policlonales obtenidos se titularon mediante IFI con el fin de conocer el nivel de anticuerpos producidos frente a *N.apis*. Se muestra a

35

continuación la pauta de las sangrías, así como, el título sérico obtenido en cada una de ellas:

Sangrías:

5

- Día 0: se realizó la extracción de la sangre por vía safena, obteniéndose un volumen de 150 µl de sangre por ratón. El suero policlonal obtenido presentó un título sérico de 0, con ausencia de respuesta humoral frente a *N. apis* .

10

- Día 49: se realizó la extracción de la sangre por vía safena, obteniéndose un volumen de 150 µl de sangre por ratón. El suero policlonal obtenido presentó un título sérico de 0 frente a *N. apis*.

15

- Día 112: se realizó la extracción de la sangre por vía safena, obteniéndose un volumen de 370 µl de sangre por ratón. El suero policlonal obtenido presentó un título sérico de 0 frente a *N. apis*.

20

- Día 131: se realizó la extracción de la sangre por vía safena, obteniéndose un volumen de 200 µl de sangre por ratón. El suero policlonal obtenido presentó un título sérico de 3.200 frente a *N. apis*.

25

- Día 182: se realizó la extracción de la sangre por vía safena, obteniéndose un volumen de 200 µl de sangre por ratón. El suero policlonal obtenido presentó un título sérico de 3.200 frente a *N. apis*.

Una vez finalizado el protocolo de inmunización, 3 ó 4 días antes de la fusión celular se administró una dosis de recuerdo por vía intravenosa para estimular las células esplénicas. Para la fusión se utilizó polietilenglicol (PEG) como agente químico fusionante de membranas.

30

Para la selección de hibridomas productores de anticuerpos específicos se utilizó el método de la IFI, enfrentando los sobrenadantes de los cultivos de los hibridomas a esporas de *N. apis* (del Aguila y col., 2001). Este método pudo determinar la reactividad y especificidad frente a antígenos o epítomos presentes en la exospora de *N. apis*, tal y como se observa en la imagen de la **Figura 2**, aunque no se puede descartar el posible inmunoreconocimiento de la endospora o de alguna estructura del esporoplasma.

35

Asimismo, se realizó la determinación del isotipo de la inmunoglobulina secretada por el hibridoma revelando la producción de una IgM (Kit *Pierce® Rapid Isotyping Kit with Kappa and Lambda-Mouse* de Thermo Scientific Cat nº 26179).

- 5 Además, se evaluó la existencia de reacciones cruzadas con *N. ceranae* y otras especies de microsporidios (*Enterocytozoon bieneusi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *E. hellem*, *E. cuniculi*, *Ancaliia algerae* y *Vittaforma corneae*) mediante IFI, observándose un mayor reconocimiento de las esporas de *N. apis* con respecto a las de otras especies cuando el sobrenadante se encontraba sin diluir. En la Tabla 1 de abajo se recoge el resultado de evaluación de reacciones cruzadas del AcMc 9G2 frente a distintas especies de microsporidios. En esta
- 10 tabla ++ = Fluorescencia de alta intensidad media; + = Fluorescencia de baja intensidad; +/- = Fluorescencia de baja intensidad sólo en algunas esporas; - = Sin fluorescencia.

TABLA 1

AcMc	Especie	Diluciones de los sobrenadantes saturados						
		Sin dil.	1/5	1/10	1/15	1/20	1/25	1/50
F4.9G2	<i>N. apis</i>	++	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-
	<i>N. ceranae</i>	+	-	-	-	-	-	-
	<i>V. corneae</i>	+/-	+/-	-	-	-	-	-
	<i>A. algerae</i>	+	-	-	-	-	-	-
	<i>E. intestinalis</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. cuniculi</i>	-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. hellem</i>	+/-	-	-	-	-	-	-
	<i>E. bieneusi</i>	-	-	-	-	-	-	-

15

- Es importante destacar la ausencia total de reactividad del anticuerpo frente a esporas de *N. ceranae*, la otra especie de *Nosema* que parasita en las colmenas de *A. mellifera* (Tabla 1). Estos resultados avalarían la utilización de los AcMc en muestras procedentes de
- 20 colmenas para el diagnóstico diferencial de las dos especies utilizando la técnica de IFI.

- La caracterización del AcMc se realizó mediante inmunoelectrotransferencia (*Western-Blot*) tanto con la especie homóloga *N. apis* como con la especie heteróloga *N. ceranae* utilizando en ambos casos extracto de espora completa. En el caso de *N. apis* se observó
- 25 un patrón de reconocimiento de bandas antigénicas comprendidas dentro del rango de 88 a 9 kDa, reconociendo con una mayor intensidad una fracción antigénica de 42 kDa, así como un doblete de bandas de 33 y 31 kDa, según muestra la **Figura 3.A**. Se realizó el estudio igualmente con la especie heteróloga *N. ceranae*. El resultado obtenido mostró un patrón de

reconocimiento de bandas antigénicas comprendidas dentro del rango de 132 a 17 kDa resaltando una fracción proteica sin resolver de 72 a 66 kDa aproximadamente, según refleja la **Figura 3.B**. Estos distintos patrones de reconocimiento del AcMc 9G2 frente al extracto de espora completa de ambas especies de *Nosema* mostrados en la Tabla 2 de abajo, donde A = *N. apis*, B = *N. ceranae* y M = marcador de peso molecular, permitirían su uso para el diagnóstico diferencial de las mismas utilizando esta técnica.

TABLA 2

199		
116		
		132
97		
		112
		99
	86	
		66-72
54		
	38	
37		
	30	
29		
	28	
20		
	17	17
	8	
7		
M	A.	B.

BIBLIOGRAFÍA:

Accoceberry, I., Thellier, M., Desportes-Livage, I., Achbarou, A., Biligui, S., Danis, M., and Datry, A. (1999). Production of monoclonal antibodies directed against the microsporidium *Enterocytozoon bienersi*. J Clin Microbiol 37, 4107-4112.

Achbarou, A., Thellier, M., Accoceberry, I., Prigneau, O., Bouladoux, N., Datry, A., Mazier, D., and Desportes-Livage, I. (1999). Production of immunological probes raised against *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis*, two microsporidian species causing intestinal infections in man. J Eukaryot Microbiol 46, 32S-33S.

- Aldras, A. M., Orenstein, J. M., Kotler, D. P., Shadduck, J. A., and Didier, E. S.** (1994). Detection of microsporidia by indirect immunofluorescence antibody test using polyclonal and monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol* 32, 608-612.
- 5 **Beckers, P. J., Derks, G. J., Gool, T., Rietveld, F. J., and Sauerwein, R. W.** (1996). Encephalocytozoon intestinalis-specific monoclonal antibodies for laboratory diagnosis of microsporidiosis. *J Clin Microbiol* 34, 282-285.
- Chauzat, J. P., Faucon, J. P., and Aubert, M.** (2004). Preliminary results of multifactorial
10 field survey of pathogens and toxicants in *Apis mellifera* colonies apiaries in France. Paper presented at: Proceedings of the first European Conference of Apidologie (Udine, Italy).
- Chen, Y., Evans, J. D., Zhou, L., Boncristiani, H., Kimura, K., Xiao, T., Litkowski, A. M., and Pettis, J. S.** (2009). Asymmetrical coexistence of *Nosema ceranae* and *Nosema apis* in
15 honey bees. *J Invertebr Pathol* 101, 204-209.
- del Aguila, C., Rueda, C., De la Camara, C., and Fenoy, S.** (2001). Seroprevalence of anti-Encephalitozoon antibodies in Spanish immunocompetent subjects. *J Eukaryot Microbiol Suppl*, 75S-78S.
- 20 **Enriquez, F. J., Ditrich, O., Palting, J. D., and Smith, K.** (1997). Simple diagnosis of Encephalitozoon sp. microsporidial infections by using a panspecific antiexospore monoclonal antibody. *J Clin Microbiol* 35, 724-729.
- 25 **FAO** (2008). Food and Agriculture Organization of the United Nations. A contribution to the international initiative for the conservation and sustainable use of pollinators : rapid assessment of pollinators. In.
- Faucon, J. P.** (2005). La nosémose. *La santé de l'Abeille* 209, 343-367.
- 30 **Fries, I.** (1989). Observations on the development and transmission of *Nosema apis* Z. in the ventriculus of honey bees. *J Apicult Research* 28, 107-117.
- Fries, I., Feng, F., da Silva, A., Slemenda, S. B., and Pieniazek, N. J.** (1996). *Nosema ceranae* n. sp. (Microspora, Nosematidae), morphological and molecular characterization of
35

a microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis cerana* (Hymenoptera, Apidae).
European Journal of Protistology 32, 656-665.

Fries, I., Lindstrom, A., and Korpela, S. (2006). Vertical transmission of American
foulbrood (*Paenibacillus larvae*) in honey bees (*Apis mellifera*). Vet Microbiol 114, 269-274.

Furuya, K., Miwa, S., Omura, M., Asakura, T., Yamano, K., Takatori, K., and Kudo, S.
(2008a). Mouse monoclonal immunoglobulin E antibodies specific for the microsporidian
Encephalitozoon cuniculi polar tube protein 1. Hybridoma (Larchmt) 27, 153-157.

Furuya, K., Omura, M., Kudo, S., Sugiura, W., and Azuma, H. (2008b). Recognition
profiles of microsporidian *Encephalitozoon cuniculi* polar tube protein 1 with human
immunoglobulin M antibodies. Parasite Immunol 30, 13-21.

Gisder, S., Mockel, N., Linde, A., and Genersch, E. (2010). A cell culture model for
Nosema ceranae and *Nosema apis* allows new insights into the life cycle of these important
honey bee-pathogenic microsporidia. Environ Microbiol.

Higes, M., Garcia-Palencia, P., Martin-Hernandez, R., and Meana, A. (2007).
Experimental infection of *Apis mellifera* honeybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). J
Invertebr Pathol 94, 211-217.

**Higes, M., Martin-Hernandez, R., Botias, C., Bailon, E. G., Gonzalez-Porto, A. V.,
Barrios, L., Del Nozal, M. J., Bernal, J. L., Jimenez, J. J., Palencia, P. G., and Meana, A.**
(2008). How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. Environ
Microbiol 10, 2659-2669.

Higes, M., Martin, R., and Meana, A. (2006). *Nosema ceranae*, a new microsporidian
parasite in honeybees in Europe. J Invertebr Pathol 92, 93-95.

Higes, M., Martín, R., and Meana, A. (2004). Chronic nosemosis in *Apis mellifera*: an
increasing problem. In Multidisciplinary for parasites, vectors and parasitic diseases.
Proceedings of the IX European Multicolloquium of Parasitology, S. Mas-Coma, M.D.
Bargues, J.G. Esteban, and M.A. Valcro, eds. (Valencia, Spain), pp. 637-638.

- Higes, M., Martín, R., Sanz, A., Álvarez, N., Sanz, A., García-Palencia, P., and Meana, A.** (2005). El síndrome de despoblamiento de las colmenas en España. Consideraciones sobre su origen. *Vida Apícola* 133, 15-21.
- 5 **Keohane, E. M., Takvorian, P. M., Cali, A., Tanowitz, H. B., Wittner, M., and Weiss, L. M.** (2001). Monoclonal antibodies to cytoplasmic antigens of *Nosema locustae* (Microsporidia: Nosematidae). *J Invertebr Pathol* 77, 81-82.
- Klee, J., Besana, A. M., Genersch, E., Gisder, S., Nanetti, A., Tam, D. Q., Chinh, T. X.,**
 10 **Puerta, F., Ruz, J. M., Kryger, P., et al.** (2007). Widespread dispersal of the microsporidian *Nosema ceranae*, an emergent pathogen of the western honey bee, *Apis mellifera*. *J Invertebr Pathol* 96, 1-10.
- Klein, A. M., Vaissiere, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A.,**
 15 **Kremen, C., and Tscharntke, T.** (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proc Biol Sci* 274, 303-313.
- Knoblett, J. N., and Youssef, N. N.** (1996). Detection of *Nosema locustae* (Microsporidia:Nosematidae) in frozen grasshoppers (Orthoptera:Acrididae) by using
 20 monoclonal antibodies. *J Econ Entomol* 89, 841-847.
- Köhler, G., and Milstein, C.** (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. . *Nature* 256, 495-497.
- 25 **Li, Y., Wu, Z., Pan, G., He, W., Zhang, R., Hu, J., and Zhou, Z.** (2009). Identification of a novel spore wall protein (SWP26) from microsporidia *Nosema bombycis*. *Int J Parasitol* 39, 391-398.
- Lujan, H. D., Conrad, J. T., Clark, C. G., Touz, M. C., Delbac, F., Vivares, C. P., and**
 30 **Nash, T. E.** (1998). Detection of microsporidia spore-specific antigens by monoclonal antibodies. *Hybridoma* 17, 237-243.
- Martin-Hernandez, R., Meana, A., Prieto, L., Salvador, A. M., Garrido-Bailon, E., and**
 35 **Higes, M.** (2007). Outcome of colonization of *Apis mellifera* by *Nosema ceranae*. *Appl Environ Microbiol* 73, 6331-6338.

- Martín, R., Meana, A., and Higes, M.** (2005). Increase of nosemosis in Spain. . In *Acta Parasitológica Portuguesa*, A.J. dos Santos Grácio, ed. (Sociedade Portuguesa de Parasitologia, Lisboa, Portugal.), pp. 49-50.
- 5 **Mo, L., and Drancourt, M.** (2002). Antigenic diversity of *Encephalitozoon hellem* demonstrated by subspecies-specific monoclonal antibodies. *J Eukaryot Microbiol* 49, 249-254.
- Mo, L., and Drancourt, M.** (2004). Monoclonal antibodies for specific detection of
10 *Encephalitozoon cuniculi*. *Clin Diagn Lab Immunol* 11, 1060-1063.
- Shamim, M., Ghosh, D., Baig, M., Nataraju, B., Datta, R. K., and Gupta, S. K.** (1997). Production of monoclonal antibodies against *Nosema bombycis* and their utility for detection of pebrine infection in *Bombyx mori* L. *J Immunoassay* 18, 357-370.
- 15 **Sheoran, A. S., Feng, X., Singh, I., Chapman-Bonofiglio, S., Kitaka, S., Hanawalt, J., Nunnari, J., Mansfield, K., Tumwine, J. K., and Tzipori, S.** (2005). Monoclonal antibodies against *Enterocytozoon bieneusi* of human origin. *Clin Diagn Lab Immunol* 12, 1109-1113.
- 20 **Visvesvara, G. S., Leitch, G. J., da Silva, A. J., Croppo, G. P., Moura, H., Wallace, S., Slemenda, S. B., Schwartz, D. A., Moss, D., Bryan, R. T., and et al.** (1994). Polyclonal and monoclonal antibody and PCR-amplified small-subunit rRNA identification of a microsporidian, *Encephalitozoon hellem*, isolated from an AIDS patient with disseminated infection. *J Clin Microbiol* 32, 2760-2768.
- 25 **Weiss, L. M., and Vossbrinck, C. R.** (1999). Molecular biology, molecular phylogeny, and molecular diagnostic approaches to the microsporidia. In *The Microsporidia and Microsporidiosis*. American Society for Microbiology, M. Wittner, and L.M. Weiss, eds. (Washington D.C.), pp. 129-171.
- 30 **Williams, P.** (2005). Does specialitation explain rarity and decline among British bumblebees? A response to Goulson et al. . *Biol conserv* 122, 33-43.
- 35 **Zhang, F., Lu, X., Kumar, V. S., Zhu, H., Chen, H., Chen, Z., and Hong, J.** (2007). Effects of a novel anti-exospore monoclonal antibody on microsporidial *Nosema bombycis* germination and reproduction in vitro. *Parasitology* 134, 1551-1558.

Zhang, Q., Singh, I., Sheoran, A., Feng, X., Nunnari, J., Carville, A., and Tzipori, S. (2005). Production and characterization of monoclonal antibodies against *Enterocytozoon bieneusi* purified from rhesus macaques. *Infect Immun* 73, 5166-5172.

5

10

15

20

25

30

35

REIVINDICACIONES

1. Anticuerpo monoclonal 9G2 específico anti-exospora, producido en hibridoma de ratón de la cepa BALB/c, seleccionado y **caracterizado** por su capacidad de reconocer epítomos presentes en la exospora de microsporidios de la especie *Nosema apis*.

2. Uso del anticuerpo monoclonal 9G2, según reivindicación 1, solo o en combinación con otros agentes, en la preparación de composiciones y sistemas de detección comerciales para el diagnóstico diferencial mediante técnicas inmunoquímicas de las nosemosis de la abeja causada por *Nosema apis*.

3. Uso del anticuerpo monoclonal 9G2 en el diagnóstico diferencial de las nosemosis de la abeja causada por *Nosema apis*, según reivindicación 2, donde las técnicas inmunoquímicas de aplicación del anticuerpo monoclonal serían las de inmunofluorescencia, indirecta (IFI) y directa (IFD), inmunoenzimáticas (ELISA) e inmunoelectrotransferencia (Western-Blot), cultivo celular y microscopía electrónica de transmisión (MET)

4. Composiciones farmacéuticas o veterinarias cuyo agente o principio reactivo es el anticuerpo monoclonal 9G2, según reivindicaciones anteriores, utilizables en cualquier técnica inmunoquímica y muestra biológica en el diagnóstico de las nosemosis de la abeja causada por *Nosema apis*.

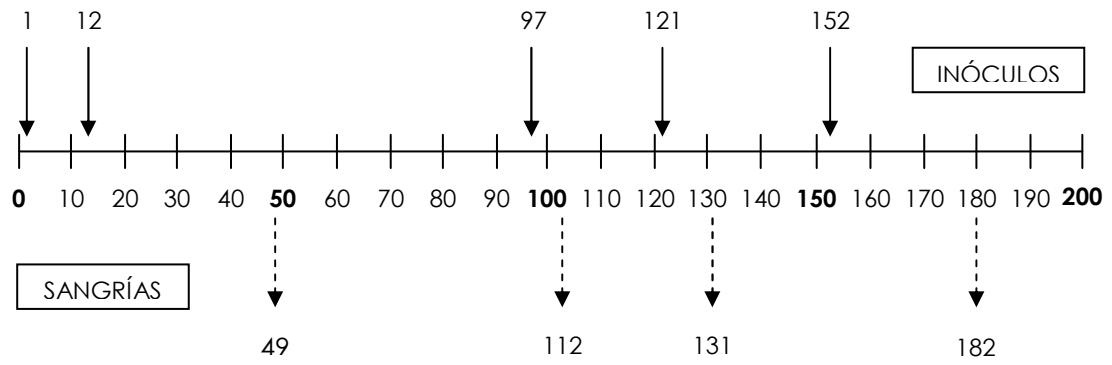


Fig. 1

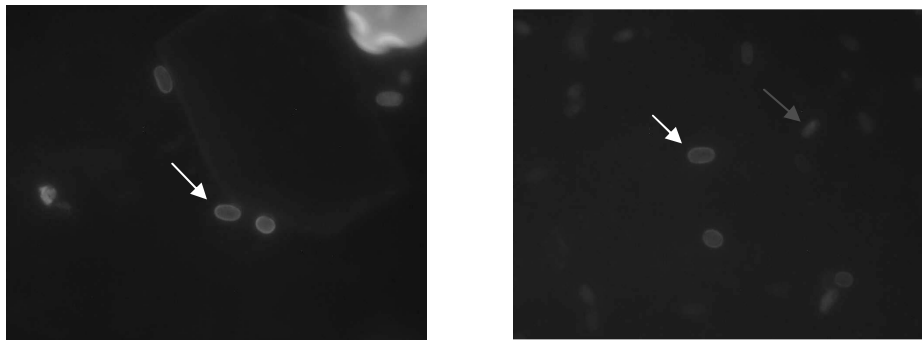


Fig. 2

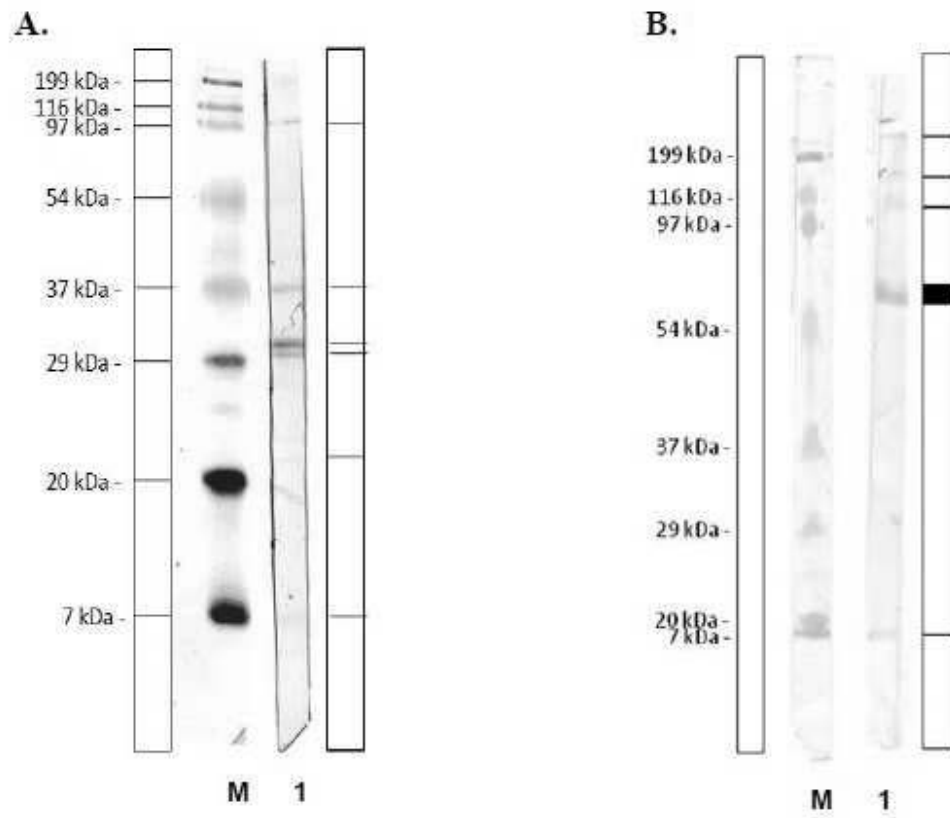


Fig. 3



- ②① N.º solicitud: 201430556
②② Fecha de presentación de la solicitud: 15.04.2014
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C07K16/14** (2006.01)
A61K39/395 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	BOURGEOIS A L et al. "Genetic detection and quantification of <i>Nosema apis</i> and <i>N. ceranae</i> in the honey bee" JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, 20100101 SAN DIEGO, CA, US 01.01.2010 VOL: 103 No: 1 Págs: 53-58 ISSN 0022-2011 Abd-Alla Adly M M; Arif Basil; todo el documento.	1-4
A	ALVAREZ-RAMOS C M et al. "Automatic classification of <i>Nosema</i> pathogenic agents through machine vision techniques and kernel-based vector machines" 2013 8th Computing Colombian Conference (8CCC), 20130821 IEEE 21.08.2013 VOL: Págs: 1-5 Doi: doi:10.1109/ColombianCC.2013.6637516; todo el documento.	1-4
A	GISDER SEBASTIAN et al. "Molecular differentiation of <i>Nosema apis</i> and <i>Nosema ceranae</i> based on species-specific sequence differences in a protein coding gene" Journal of Invertebrate Pathology MAY 2013 (05.2013) VOL: 113 No: 1 Págs: 1-6 ISSN 0022-2011(print) ISSN 1096-0805(electronic) Doi: doi:10.1016/j.jip.2013.01.004; todo el documento.	1-4
A	CHEN Y et al. "Asymmetrical coexistence of <i>Nosema ceranae</i> and <i>Nosema apis</i> in honey bees" JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, 20090701 SAN DIEGO, CA, US 01.07.2009 VOL: 101 No: 3 Págs: 204-209 ISSN 0022-2011 Doi: doi:10.1016/j.jip.2009.05.012 Abd-Alla Adly M M; Arif Basil; todo el documento.	1-4

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
23.09.2015

Examinador
M. Á. García Coca

Página
1/4

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

C07K, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, BIOSIS, EMBASE/ELSEVIER, MEDLINE/NLM, XPESP, COMPENDEX, INSPEC

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 23.09.2015

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-4	SI
	Reivindicaciones	NO

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

Base de la Opinión.-

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

1. Documentos considerados.-

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

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	BOURGEOIS A L et al. "Genetic detection and quantification of <i>Nosema apis</i> and <i>N. ceranae</i> in the honey bee" JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, 20100101 SAN DIEGO, CA, US 01.01.2010 VOL: 103 No: 1 Págs: 53-58 ISSN 0022-2011 Abd-Alla Adly M M; Arif Basil.	01.01.2010
D02	ALVAREZ-RAMOS C M et al." Automatic classification of <i>Nosema</i> pathogenic agents through machine vision techniques and kernel-based vector machines" 2013 8th Computing Colombian Conference (8CCC), 20130821 IEEE 21.08.2013 VOL: Págs: 1-5 Doi: doi:10.1109/ColombianCC.2013.6637516.	21.08.2013
D03	GISDER SEBASTIAN et al. "Molecular differentiation of <i>Nosema apis</i> and <i>Nosema ceranae</i> based on species-specific sequence differences in a protein coding gene" Journal of Invertebrate Pathology MAY 2013 (05.2013) VOL: 113 No: 1 Págs: 1-6 ISSN 0022-2011(print) ISSN 1096-0805(electronic) Doi: doi:10.1016/j.jip.2013.01.004.	30.04.2013
D04	CHEN Y et al." Asymmetrical coexistence of <i>Nosema ceranae</i> and <i>Nosema apis</i> in honey bees" JOURNAL OF INVERTEBRATE PATHOLOGY, 20090701 SAN DIEGO, CA, US 01.07.2009 VOL: 101 No: 3 Págs: 204-209 ISSN 0022-2011 Doi: doi:10.1016/j.jip.2009.05.012 Abd-Alla Adly M M; Arif Basil.	01.07.2009

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

El objeto de la invención, tal y como se recoge en las reivindicaciones 1-4, es un anticuerpo monoclonal específico anti-exospora, producido en hibridoma de ratón de la cepa BALB/c, capaz de reconocer epítomos presentes en la exospora de microsporidios de la especie *Nosema apis* (reiv. 1). Es también objeto de la invención el uso de dicho anticuerpo para la preparación de composiciones y sistemas de detección para el diagnóstico de nosemosis de la abeja causada por *Nosema apis* (reiv. 2-4).

Novedad (art. 6.1 de la Ley 11/1986 de Patentes) y Actividad Inventiva (art. 8.1 de la Ley 11/1986 de Patentes).

El documento D01 divulga un ensayo mediante PCR en tiempo real para la detección y cuantificación de *Nosema apis* y *Nosema ceranae* de forma simultánea en la misma muestra y en una única reacción.

El documento D02 divulga un método de identificación y clasificación de los microsporidios de *N. ceranae* y *N. apis*, basado en una combinación de técnicas de segmentación y procesamiento de imágenes obtenidas mediante microscopía.

El documento D03 divulga un método de diferenciación entre *N. ceranae* y *N. apis*, mediante una PCR dúplex (dúplex PCR), basado en las diferencias de secuencia especie-específica de la secuencia altamente conservada del gen que codifica para la subunidad mayor de la RNA polimerasa II dependiente de DNA.

El documento D04 divulga un análisis filogenético para diferenciar y cuantificar *N. ceranae* y *N. apis*, basado en una PCR dúplex en tiempo real (dúplex real-time qPCR) basado en las diferencias en la región variable de la subunidad pequeña del RNA ribosomal (SSUrRNA).

No se ha encontrado en el estado de la técnica, un anticuerpo capaz de reconocer epítomos presentes en la exospora de microsporidios de la especie *Nosema apis*. Ninguno de los documentos citados, tomados solos o en combinación, revelan la invención definida en las reivindicaciones 1-4. Además, en los documentos citados no hay sugerencias que dirijan al experto en la materia hacia la invención definida por las reivindicaciones 1-4, por lo tanto, la invención reivindicada en las reivindicaciones 1-4 es, con referencia a los documentos D01-D04, nueva y se considera que implica actividad inventiva.