

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 952**

51 Int. Cl.:

C07K 14/44 (2006.01)

A61K 39/002 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2013 PCT/FR2013/051877**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.02.2014 WO14020291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013 E 13801610 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 2880051**

54 Título: **Cepas mutantes de neospora y sus usos**

30 Prioridad:

02.08.2012 FR 1257544

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

24.04.2020

73 Titular/es:

**BIO-SOURCING (100.0%)
GIGA Entreprises, Espace 1,
Avenue Hippocrate, 5
4000 Liège, BE**

72 Inventor/es:

**BOUSSEMART-PROUVOST, ANNE-FRANCE;
BRETON, PASCAL;
LAMARQUE, MAULD;
MORISSE-PHILIPPE, SOLEN y
SECHE, EDOUARD**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 755 952 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

Cepas mutantes de neospora y sus usos

La presente invención se refiere a una cepa mutante de *Neospora spp*, su uso en una composición farmacéutica y su uso en una composición de vacuna.

5 *Neospora caninum* es un parásito intracelular, responsable de la neosporosis. Pertenece al filo Apicomplejos (división de Apicomplexa) que agrupa una gran cantidad de parásitos principalmente intracelulares. Estos parásitos son responsables de enfermedades la neosporosis, toxoplasmosis, paludismo, coccidiosis y criptosporidiosis. Comparten un proceso específico de invasión de células huésped en varias etapas que conducen a la formación de una vacuola parasitofórica en la que se desarrolla el parásito.

10 El ciclo de vida de *Neospora caninum* presenta dos fases distintas: una fase asexual en un huésped intermedio tal como ratón, ovinos y bovinos que conduce a la producción de taquizoítos y después quistes que contienen bradizoítos, y una fase sexual en el huésped definitivo (principalmente el perro) que conduce a la producción de ooquistes, que contienen esporozoítos, eliminados en las heces.

15 La neosporosis animal plantea un problema económico significativo en el campo del cultivo agrícola y particularmente en las cría de ganado, donde causa una reducción del aumento de peso de los terneros, una disminución de la fertilidad, una disminución en la producción de leche pero se reconoce principalmente como una de las principales causas de abortos. De este modo, cada año en el mundo, de 30 a 40 millones de abortos son causados por *Neospora caninum* en rebaños de ganado. Contrariamente a *Toxoplasma gondii*, la transmisión materno-fetal del parásito y la infección congénita del feto intervienen no solo en el caso de infección primaria durante la gestación sino también en vacas infectadas crónicamente antes de la gestación.

La contaminación bovina se puede hacer de dos maneras distintas:

- Por contaminación horizontal, es decir, por ingestión de alimentos contaminados con ooquistes excretados por un huésped definitivo. En caso de gestación, el riesgo de aborto es del 80 %.
- 25 • Por contaminación vertical, es decir, por transmisión materno-fetal del parásito de la madre a sus terneros. Una vaca infectada antes de la gestación, durante las siguientes gestaciones puede, abortar de nuevo, dar a luz a un ternero sano, o, casi siempre, transmitir el parásito a su ternero. Este ternero estará infectado por *Neospora caninum* y si, se trata de una hembra, tendrá, a su vez, un alto riesgo de transmitir el parásito a su descendencia con posibilidad de aborto.

30 Estas consecuencias evidentemente tienen importantes repercusiones económicas para las granjas. De este modo, La neosporosis es responsable de una pérdida de 35 M€ para 1,2 millones de vacas lecheras en California (Dubey, J. Am. Vet. Med. Assoc., 1999, 15 abril; 214 (8): 1160-3), 19 M€ para 1,6 millones de vacas en los Países Bajos (Bartels y col., Vet. Parasitol., 2006, 15 abril; 137 (1-2): 17-27) y 10 M€ para 0,7 millones de vacas en Suiza (Häsler y col., Prev. Vet. Med., 2006, 18 Dic; 77 (3-4): 230-53).

35 El desarrollo de una vacuna es un objetivo principal en la lucha contra la neosporosis. Actualmente se están estudiando varias estrategias para construir una vacuna contra la neosporosis:

- vacunas basadas en parásitos inactivados por radiación, por calor, etc. Estas vacunas generan una respuesta inmunitaria protectora, pero generalmente requieren la presencia de adyuvantes y también muchos recordatorios de vacunación. Actualmente, solo una vacuna contra la neosporosis bovina se comercializa en ciertas zonas geográficas, particularmente en Estados Unidos. Esta es la vacuna NeoGuard® comercializada por la compañía Intervet. Esta vacuna consiste en taquizoítos inactivados de *Neospora caninum* y un adyuvante particular (Havlogen). La efectividad de la vacuna NeoGuard®, aproximadamente 50 %, se considera parcial. Por otra parte, el modo de administración de esta vacuna requiere dos inyecciones con algunas semanas de diferencia durante el primer año de vacunación y luego una o dos inyecciones en los años siguientes.
- 40 • Vacunas basadas en parásitos vivos atenuados; estas cepas generalmente se obtienen *in vitro* por pases sucesivos del parásito en cultivo en células huésped en presencia o ausencia de agentes mutagénicos, por aislamiento en la naturaleza de cepas menos virulentas, o por otros procedimientos como irradiación. Estas vacunas son generalmente muy efectivas pero tienen la desventaja principal de no ser caracterizadas a nivel molecular y siempre se temen retornos hacia una forma virulenta. Varios aislados como Nc-Nowra (Miller y col., Aust. Vet. J., 2002, Oct; 80 (10): 620-5) y Nc-Spain-1H (Regidor-Cerrillo y col., Parasitology, 2008, Dic; 135 (14): 1651-9) se aislaron de terneros infectados asintomáticamente. Se está evaluando el potencial de vacuna de estas cepas atenuadas.
- Vacunas recombinantes: un virus de la vacuna que expresa el antígeno NcSRS2 de *N. caninum* se evaluó en experimentos de vacunación en ratones (Nishikawa y col., Parasitol. Res., 2000, Nov; 86 (11): 934-9; Nishikawa y col., Vaccine, 2001, 8 enero; 19 (11-12): 1381-90) y ha demostrado su capacidad para inducir una respuesta inmunitaria protectora en ratones. Más recientemente, una cepa de *Brucella abortus* se usó para expresar diferentes antígenos de *N. caninum* (Ramamoorthy y col., Int. J. Parasitol., 2007, Nov; 37 (13): 1531-8 y Ramamoorthy y col., Int J Parasitol., noviembre de 2007; 37 (13): 1521-9). Las cepas que expresan la proteína NcMIC1 o la proteína NcGRA6 protegen eficazmente a los ratones de *N. caninum* pero plantean el problema del

uso de una cepa patógena en bovinos.

- Vacunas subunitarias compuestas de proteínas derivadas de parásitos capaces de inducir una respuesta inmunitaria protectora. Estas vacunas generalmente requieren la presencia no solo de adyuvantes, sino también muchos recordatorios de vacunación y, en general, son menos efectivas en términos de la respuesta inmunitaria inducida en el individuo vacunado. Se han realizado varios ensayos de vacunación con diferentes proteínas antigénicas. De este modo, la inoculación de la proteína NcSRS2 en ratones bloquea la transmisión materno-fetal (Haldorson y col., Int. J. Parasitol., 2005, noviembre; 35 (13): 1407-15) y está asociada al adyuvante de Freund, induce una respuesta inmunitaria cercana a la respuesta inmunitaria inducida por la inoculación de taquizoítos *N. caninum* (Staska y col., Infect. Immun., 2005, marzo; 73 (3): 1321-9). También se han realizado ensayos de vacunación en ratones con la proteína NcMIC1 o NcMIC3 y han demostrado una prevención de las infecciones cerebrales después de una estimulación infecciosa (Cannas y col., J. Parasitol., 2003, febrero; 89 (1): 44-50; Allaedine y col., J. Parasitol., 2005, junio; 91 (3): 657-65). También se ha demostrado que los anticuerpos de ratón inmunizados con la proteína Nc-AMA1 reducen significativamente la infección celular de *N. caninum*.

A pesar de las fuertes consecuencias económicas en las granjas bovinas, ninguna vacuna efectiva, segura y fácil de usar se comercializa actualmente o está en fase de desarrollo. Existe, en consecuencia, una necesidad real de proporcionar una vacuna que sea efectiva contra la neosporosis, fácil de usar y con inocuidad excelente.

Sorprendentemente, los inventores han descubierto que la eliminación de la función de la proteína NcMIC3 sola, o la supresión de la función de las dos proteínas NcMIC3 y NcMIC1, en una cepa de *Neospora caninum*, conduce a una cepa mutante que tiene propiedades infecciosas e inmunogénicas que confieren a los mamíferos la protección de la vacuna contra los efectos nocivos de la neosporosis.

La presente descripción desvela una cepa mutante de *Neospora spp* en la que la función de la proteína NcMIC3 se suprime.

El objeto de la presente invención es, por lo tanto, una cepa mutante de *Neospora spp* en la que la función de la proteína NcMIC3 y, opcionalmente, la función de la proteína NcMIC1, se suprime.

El objeto de la presente invención es, por lo tanto, una cepa mutante de *Neospora spp* en la que se suprime la función de la proteína NcMIC3, especialmente por una inhibición de la expresión del gen *ncmic3*, y opcionalmente se suprime la función de la proteína NcMIC1, especialmente por una inhibición de la expresión del gen *ncmic1*.

Las proteínas son los efectores de la actividad celular. La eliminación de la función de una proteína puede resultar de su ausencia de biosíntesis o falta de funcionalidad. El origen de esta disfunción puede estar relacionado con alteraciones que ocurren durante la transcripción del gen que codifica la proteína, durante su traducción o incluso pueden aparecer durante el proceso de procesamiento de proteínas (modificaciones postraduccionales). La delección del gen también explica que no se puede sintetizar ninguna proteína.

Las proteínas NcMIC1 y NcMIC3 son proteínas de los micronemas, orgánulos secretores de los Apicomplejos que juegan un papel fundamental en el reconocimiento y la adherencia a las células huésped. En *Neospora caninum*, la proteína NcMIC1 es una proteína de 460 aminoácidos codificada por el gen *ncmic1* que tiene 4 exones. La secuencia de polipéptidos de NcMIC1 contiene un péptido señal de 20 aminoácidos seguido por dos regiones repetidas (48 aminoácidos y 44 aminoácidos) en tándem (Keller y col., Infect Immun. junio de 2002; 70 (6): 3187-98).

La proteína NcMIC3 de *Neospora caninum* está codificada por el gen *ncmic3* que comprende un solo exón. Esta proteína tiene 362 aminoácidos.

Los inventores construyeron una cepa mutante de *Neospora caninum* llamada Neo *ncmic1-3* KO, en la que se suprimieron la función de la proteína NcMIC1 y la función de la proteína NcMIC3, una cepa mutante Neo *ncmic3* KO, en la que solo se suprimió la función de la proteína NcMIC3 y, una cepa mutante Neo *ncmic1* KO, en la que solo se suprimió la función de la proteína NcMIC1. Estas tres cepas mutantes de *Neospora caninum* son el primer ejemplo de cepas vivas atenuadas de *Neospora caninum* obtenidas por la delección dirigida y controlada de genes de virulencia o por la supresión dirigida y controlada de funciones proteicas de virulencia.

En la presente invención, por "se suprime la función de la proteína NcMIC1" se entiende, la ausencia de la expresión de la proteína NcMIC1, la expresión de una proteína NcMIC1 no funcional, por ejemplo la expresión de una proteína que no tiene la función de la proteína NcMIC1 y que tiene una cierta identidad de secuencia de aminoácidos con la de la proteína NcMIC1.

Por "se suprime la función de la proteína NcMIC3" se entiende, la ausencia de la expresión de NcMIC3, la expresión de una proteína NcMIC3 no funcional, por ejemplo una proteína que no tiene la función de la proteína NcMIC3 y que tiene una cierta identidad de secuencia de aminoácidos con la de la proteína NcMIC3.

La ausencia de la expresión de la proteína NcMIC1 o de la proteína NcMIC3 puede resultar de la delección de todo el gen *ncmic1* o *ncmic3*, o su región codificante, o una mutación, delección o inserción de uno o varios nucleótidos en la región codificante del gen *ncmic1* o *ncmic3* dando como resultado la ausencia de expresión de proteínas o proteínas con poca identidad de secuencia de aminoácidos con proteínas NcMIC1 o NcMIC3, o disfunción de la región promotora

o región reguladora en *cis* o en *trans* del gen *ncmic1* ou *ncmic3*, o una disfunción de uno o más factores de transcripción capaces de unirse a dicha región promotora, o una disfunción de la traducción del ARN mensajero, o de algunas modificaciones epigenéticas bien conocidas por el experto en la materia. Por tanto, por "inhibición de la expresión del gen *ncmic1* o *ncmic3*" se entiende, todos los mecanismos que interrumpen la transcripción del gen *ncmic1* o *ncmic3* en un ARN mensajero o en todos los mecanismos que interrumpen la traducción de los ARN mensajeros en proteínas NcMIC1 o NcMIC3, siendo estas dos etapas necesarias para la síntesis de una proteína NcMIC1 o NcMIC3 funcional.

Una proteína NcMIC1 no funcional o una proteína NcMIC3 no funcional es una proteína que no tiene la capacidad de reconocer las células huésped o que no permite la adhesión del parásito a dichas células huésped. Una proteína no funcional puede resultar de una mutación, deleción o inserción de uno o varios nucleótidos en la región codificante del gen *ncmic1* o *ncmic3*. En este caso, la modificación del ácido nucleico de la región codificante no bloquea el mecanismo de expresión de la proteína que opcionalmente puede retener una cierta identidad de secuencia de aminoácidos con la de la proteína NcMIC1 o la de la proteína NcMIC3, pero cambia el marco de lectura del ARNm correspondiente durante la traducción de la proteína. La no funcionalidad de la proteína NcMIC3, o de la proteína NcMIC1, también puede ser la consecuencia de modificaciones postraduccionales ineficaces o insuficientes (es decir, glicosilación, isoprenilación, fosforilación, sulfatación, amidación, acetilación, alquilación, etc.) y que les permite cumplir su función.

La función de la proteína NcMIC3, o la proteína NcMIC1, también se puede suprimir indirectamente, en particular alterando o suprimiendo la expresión de una o más proteínas (especialmente otras adhesinas) que se unen a la proteína NcMIC3, o a la proteína NcMIC1, para formar un complejo funcional. La desestructuración de un complejo de ese tipo da como resultado una pérdida de la función de la proteína NcMIC3, o de la proteína NcMIC1.

En una realización particular, la invención se refiere a una cepa mutante de *Neospora* en la que solo se suprime la función de la proteína NcMIC3.

Los inventores han descubierto que la supresión de la función de la proteína NcMIC3 sola en *Neospora caninum* reduce significativamente la virulencia *in vivo* del parásito. Sin embargo, la doble supresión de la función de la proteína NcMIC3 y la función de la proteína NcMIC1 en *Neospora caninum* acentúa aún más la atenuación de la virulencia del parásito.

En una realización particular, la invención se refiere a una cepa mutante de *Neospora spp* en la que la función de la proteína NcMIC3 y la función de la proteína NcMIC1 se suprimen.

En una realización particular, la invención se refiere a una cepa mutante de *Neospora spp* en la que tanto la función de la proteína NcMIC3 como la función de la proteína NcMIC1 se suprimen por una inhibición de la expresión de los dos genes *ncmic3* y *ncmic1*.

La función de la proteína NcMIC3 de la cepa mutante de *Neospora spp* se puede suprimir por:

- una mutación, deleción o inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen *ncmic3* o en una secuencia de nucleótidos que condiciona la expresión de la proteína NcMIC3, o
- una desestabilización del ARN mensajero resultante de la transcripción del gen *ncmic3*, o
- una inhibición de la traducción del ARN mensajero del gen *ncmic3* o una secuencia de nucleótidos que condiciona la expresión de la proteína NcMIC3.

La función de la proteína NcMIC1 de la cepa mutante de *Neospora spp* se puede suprimir por:

- una mutación, deleción o inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen *ncmic1* o en una secuencia de nucleótidos que condiciona la expresión de la proteína NcMIC1, o
- una desestabilización del ARN mensajero resultante de la transcripción del gen *ncmic1*, o
- una inhibición de la traducción del ARN mensajero del gen *ncmic1* o una secuencia de nucleótidos que condiciona la expresión de la proteína NcMIC1.

Por "mutación de uno o varios nucleótidos", se entiende la sustitución, permutación o reemplazo de uno o varios nucleótidos de una secuencia de nucleótidos con uno o más nucleótidos no presentes en la secuencia de tipo silvestre. Por secuencia silvestre, se refiere a la secuencia de nucleótidos que se encuentra en estado natural en la cepa silvestre del parásito. La secuencia silvestre está, por definición, desprovista de cualquier intervención humana mediante ingeniería genética. En la presente invención, la cepa silvestre de referencia de *N. caninum* es la cepa NC1.

Por "supresión de uno o más nucleótidos", se entiende la supresión de uno o más nucleótidos de una secuencia de nucleótidos.

Por "inserción de uno o más nucleótidos", se entiende la adición, adición o integración de uno o varios nucleótidos en una secuencia de nucleótidos.

La mutación, deleción o inserción de uno o varios nucleótidos puede tener lugar dentro de uno o más exones del gen correspondiente y, por lo tanto, modificar la región codificante de dicho gen, o tener lugar dentro de uno o más varios intrones y modificar el sitio de empalme de un intrón en cuestión. Por tanto, esta modificación del sitio de empalme

cambia el marco de lectura del ARNm y da como resultado la traducción de una nueva proteína cuya secuencia de aminoácidos difiere de la secuencia de la denominada proteína de tipo silvestre.

5 Por "desestabilización del ARN mensajero", se entiende una disminución de su vida media, es decir, el período de tiempo durante el cual el ARN mensajero está disponible para permitir su traducción en una proteína. La estabilización de los ARN mensajeros está asegurada por elementos *cis* (las secuencias UTR en 5' y 3' que bordean las secuencias codificantes de un gen) y elementos *trans*, especialmente proteínas capaces de unirse a los elementos *cis*. La vida media de un ARN mensajero puede variar como respuesta a diversos estímulos, como factores ambientales, factores de crecimiento u hormonas. Una modificación, realizada *in vitro* por ingeniería genética, secuencias de nucleótidos de elementos *cis* es susceptible de modificar la vida media del ARN mensajero.

10 Por "inhibición de la traducción del ARN mensajero de un gen", se entiende el bloqueo de la traducción del ARN mensajero en la proteína correspondiente. En este caso, el ARN mensajero de un gen está presente en la célula, mientras que la proteína correspondiente está ausente. La inhibición de la traducción del ARN mensajero de un gen puede ser el resultado de la disfunción de un elemento de la maquinaria traduccional, especialmente ribosomas, ARN ribosómico (ARNr) o ARN de transferencia (ARNt), o aminoacil-ARNt sintetasas.

15 En una realización más particular, la invención se refiere a una cepa mutante de *Neospora spp*, en la que:

- la función de la proteína NcMIC3 se suprime por una mutación, delección o inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen *ncmic3*, y opcionalmente
- la función de la proteína NcMIC1 se suprime por una mutación, delección o inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen *ncmic1*.

20 Tal mutación, delección o inserción de uno o más nucleótidos en la secuencia de nucleótidos del gen *ncmic3* o del gen *ncmic1* puede conducir a la ausencia de expresión de la proteína NcMIC3 o NcMIC1, o a la producción de una proteína no funcional con o sin una cierta identidad de secuencia de aminoácidos con la de la proteína NcMIC3 o NcMIC1.

25 De manera más particular, la invención se refiere a una cepa mutante de *Neospora spp*, en la que tanto a la vez la función de la proteína NcMIC3 y la función de la proteína NcMIC1 se suprimen por una mutación, una delección o inserción de uno o más nucleótidos en las secuencias de nucleótidos de los genes *ncmic3* y *ncmic1*.

En otra realización particular, la invención se refiere a una cepa mutante de *Neospora spp*, en la que:

- 30
- la función de la proteína NcMIC3 se suprime mediante la delección de todo o parte del gen *ncmic3* o su región promotora, y opcionalmente
 - la función de la proteína NcMIC1 se suprime mediante la delección de todo o parte del gen *ncmic1* o su región promotora.

Por "delección del gen" se entiende, la eliminación de todo el gen, es decir, los intrones y los exones, o la región codificante completa del gen, es decir, solo los exones. Por "región promotora" se entiende, la secuencia de nucleótidos ubicada cadena arriba de la región 5' UTR transcrita no traducida que sirve como caja para regular la expresión de un gen.

35 De manera más particular, la invención se refiere a una cepa mutante de *Neospora spp*, en la que la función de la proteína NcMIC3 se suprime mediante delección de todo o parte del gen *ncmic3* o su región promotora y la función de la proteína NcMIC1 se suprime mediante la delección de todo o parte del gen *ncmic1* o su región promotora.

En otra realización particular, la invención se refiere a una cepa mutante de *Neospora spp*, en la que:

- 40
- la función de la proteína NcMIC3 se suprime por una mutación, delección o inserción de uno o más nucleótidos en una secuencia de nucleótidos que condiciona la expresión de la proteína NcMIC3, y opcionalmente
 - la función de la proteína NcMIC1 se suprime por una mutación, delección o inserción de uno o más nucleótidos en una secuencia de nucleótidos que condiciona la expresión de la proteína NcMIC1.

De manera más particular, la invención se refiere a una cepa mutante de *Neospora spp*, en la que

- 45
- la función de la proteína NcMIC3 se suprime por una mutación, delección o inserción de uno o más nucleótidos en una secuencia de nucleótidos que condiciona la expresión de la proteína NcMIC3, y
 - la función de la proteína NcMIC1 se suprime por una mutación, delección o inserción de uno o más nucleótidos en una secuencia de nucleótidos que condiciona la expresión de la proteína NcMIC1.

En una realización particular, la cepa mutante de *Neospora spp* según la presente invención es una cepa mutante de *Neospora caninum*.

50 La presente invención también tiene como objeto proporcionar una composición farmacéutica que comprende una cepa mutante de *Neospora* en la que la función de la proteína NcMIC3, y opcionalmente la función de la proteína NcMIC1, se suprime.

Dicha composición farmacéutica comprende una cepa mutante como se describe anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

De manera más particular, dicha composición farmacéutica se administra en una dosis unitaria que varía de 10^2 a 10^9 taquizoítos de una cepa mutante de *Neospora spp.*

- 5 De manera más particular, dicha composición farmacéutica se administra en una dosis unitaria que varía de 10^2 a 10^9 taquizoítos de la cepa Neo *ncmic1-3* KO.

Incluso más particularmente, dicha composición farmacéutica se administra en una dosis unitaria que varía de 10^3 a 10^8 , especialmente de 10^4 a 10^7 , especialmente de 10^5 a 10^6 taquizoítos de la cepa Neo *ncmic1-3* KO.

- 10 Incluso más particularmente, dicha composición farmacéutica se administra en una dosis unitaria que varía de 10^2 a 10^8 , especialmente de 10^2 a 10^7 , especialmente de 10^2 a 10^6 , especialmente de 10^2 a 10^5 , especialmente de 10^2 a 10^4 , especialmente de 10^2 a 10^3 taquizoítos de la cepa Neo *ncmic1-3* KO.

Incluso más particularmente, dicha composición farmacéutica se administra en una dosis unitaria de 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 , o 10^9 taquizoítos de la cepa Neo *ncmic1-3* KO.

- 15 En una realización más particular, la primera administración puede ser seguida por posibles recordatorios posteriores, según las dosis unitarias indicadas anteriormente.

Por otra parte, la presente invención tiene como objeto proporcionar una composición de vacuna que comprende una cepa mutante *Neospora spp* según la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Dicha composición farmacéutica o composición de vacuna puede administrarse por vía parenteral (intravenosa, subcutánea, intradérmica, intramuscular, e intraperitoneal) o por vía enteral.

- 20 La elección de un vehículo farmacéutico aceptable contenido en dicha composición farmacéutica o composición de vacuna puede hacerse según el modo de administración previsto sobre la base del conocimiento de los expertos en la materia.

- 25 Tal composición farmacéutica o de vacuna puede usarse para el tratamiento de neosporosis por infección primaria, reactivación o reinfección en animales de compañía, como perros y caballos, y ganado, como ovinos, caprinos, bovinos, porcinos, camélidos y cérvidos.

- 30 De manera más particular, tal composición farmacéutica o de vacuna puede usarse para el tratamiento de neosporosis por infección primaria, reactivación o reinfección en animales de compañía, como perros y caballos, y ganado, como ovinos, caprinos, bovinos, porcinos, camélidos y cérvidos y especialmente para prevenir la transmisión materno-fetal del parásito para reducir la cantidad de abortos pero también el riesgo de contaminación vertical de las madres a sus descendientes.

- 35 Incluso más particularmente, tal composición farmacéutica o de vacuna puede usarse para el tratamiento de neosporosis por infección primaria, reactivación o reinfección en animales de compañía, como perros y caballos, y ganado, como ovinos, caprinos, bovinos, porcinos, camélidos y cérvidos y especialmente para prevenir la transmisión materno-fetal del parásito a fin de reducir la cantidad de abortos, pero también el riesgo de contaminación vertical de las madres a sus descendientes en caso de infección durante la gestación (es decir, infección aguda) pero también antes de la gestación (es decir, infección crónica).

- 40 La descripción también describe un procedimiento de diagnóstico *in vitro* para diferenciar animales vacunados con las cepas mutantes Neo *ncmic1* KO, Neo *ncmic3* KO, Neo *ncmic1-3* KO y animales infectados naturalmente con las cepas silvestres de *N. caninum*. Estos ensayos de diagnóstico, denominados DIVA, (Differentiating Infected from Vaccinated Animal) son cada vez más requeridos por las autoridades reguladoras, en particular para la farmacovigilancia y los estudios epidemiológicos, pero también para identificar las posibles razones de los abortos en animales vacunados.

La descripción también describe un procedimiento *in vitro* de diagnóstico diferencial para discriminar un mamífero vacunado con las composiciones de la invención de un mamífero no vacunado, comprendiendo dicho procedimiento una etapa de:

- 45 - determinación de la concentración de anticuerpos anti-NcMIC1 y/o anti-NcMIC3 y/o anti-DHFR y/o anti-CAT-GFP, y/o,
 - determinación de la concentración de antígeno NcMIC1 y/o NcMIC3 y/o DHFR y/o CAT-GFP,
 - determinación del nivel de expresión de los genes *ncmic1*, *ncmic3*, *dhfr* y/o *cat-gfp*, y/o
 - determinación de la presencia o ausencia de genes *ncmic1*, *ncmic3*, *dhfr* y/o *cat-gfp*,

- 50 en una muestra biológica del mamífero mencionado anteriormente.

La descripción también describe un procedimiento *in vitro* de diagnóstico diferencial para discriminar un mamífero vacunado con las composiciones de la invención de un mamífero no vacunado, comprendiendo dicho procedimiento

las siguientes etapas:

- 5 i) determinación de la concentración de anticuerpos anti-NcMIC1 y/o anti-NcMIC3 y/o anti-DHFR y/o anti-CAT-GFP, y/o, determinación de la concentración de antígeno NcMIC1 y/o NcMIC3 y/o DHFR y/o CAT-GFP, ii) determinación del nivel de expresión de los genes *ncmic1*, *ncmic3*, *dhfr* y/o *cat-gfp*, y/o, determinación de la presencia o ausencia de los genes *ncmic1*, *ncmic3*, *dhfr* y/o *cat-gfp*,

en una muestra biológica del mamífero mencionado anteriormente.

10 La presente invención también se refiere a un procedimiento *in vitro* de diagnóstico diferencial para discriminar si un mamífero es un mamífero vacunado con una composición como se define según la invención, o un mamífero no vacunado, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:

- 15 i) determinación de la presencia de anticuerpos anti-DHFR y/o anti-CAT-GFP, y/o, determinación de la presencia de antígenos DHFR y/o CAT-GFP, o ii) determinación del nivel de expresión de los genes *dhfr* y/o *cat-gfp*, y/o, determinación de la presencia de los genes *dhfr* y/o *cat-gfp*,

en una muestra biológica del mamífero mencionado anteriormente, determinación de la presencia de anticuerpos anti-DHFR y/o anti-CAT-GFP, y/o determinación de la presencia de antígenos DHFR y/o CAT-GFP, o determinación del nivel de expresión de los genes *dhfr* y/o *cat-gfp*, y/o determinación de la presencia de genes *dhfr* y/o *cat-gfp*, significando que dicho mamífero es un mamífero vacunado.

20 Según una realización particular, el procedimiento de la descripción o de la invención puede implementarse en una muestra biológica seleccionada entre el grupo constituido por sangre y suero, pero también ciertos tejidos y órganos tales como la placenta, cerebro, músculos, etc.

Las cepas silvestres de *Neospora caninum* tienen en su genoma los genes *ncmic1* y *ncmic3* y expresan las proteínas NcMIC1 y NcMIC3.

25 Las cepas mutantes de *Neospora caninum* como se define según la presente invención tienen respectivamente:

- 30 - el gen *ncmic1* y el gen de selección *dhfr* para la cepa mutante Neo *ncmic3* KO; el gen de selección *dhfr* se inserta por recombinación homóloga en lugar del gen *ncmic3* en el genoma de esta cepa mutante. La cepa mutante Neo *ncmic3* KO expresa las proteínas NcMIC1 y DHFR y no expresa la proteína NcMIC3, - los genes de selección *dhfr* y *cat-gfp* para la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO; los genes de selección y *cat-gfp* se insertan por recombinación homóloga en lugar del gen respectivamente *ncmic3* y *ncmic1* en el genoma de esta cepa mutante. La cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO expresa las proteínas DHFR y CAT-GFP y no expresa las proteínas NcMIC1 y NcMIC3.

35 El diagnóstico entre animales vacunados con cepas mutantes de la descripción o invención y animales infectados con cepas silvestres de *N. caninum* puede ser indirecta y basada en la detección e identificación de anticuerpos, o directa y basada en la detección del agente infeccioso con tecnologías inmunológicas o moleculares.

La presente descripción también desvela un procedimiento para resaltar, en una muestra biológica seleccionada en particular entre el grupo constituido por sangre y suero derivado de un mamífero, un anticuerpo anti-NcMIC1 y/o un anticuerpo anti-NcMIC3 y/o un anticuerpo anti-DHFR y/o un anticuerpo anti-CAT-GFP, comprendiendo dicho procedimiento la siguiente etapa:

- 40 - determinación de la presencia de al menos un anticuerpo presente en una muestra biológica previamente tomada de un mamífero por formación *in vitro* un complejo inmune, estando dicho complejo inmunitario constituido por la proteína NcMIC1 unida al anticuerpo anti-NcMIC1 o la proteína NcMIC3 unida al anticuerpo anti-NcMIC3 o la proteína DHFR unida al anticuerpo anti-DHFR o la proteína CAT-GFP unida al anticuerpo anti-CAT-GFP, por comparación con una muestra biológica de referencia.

45 Por "complejo inmune", se entiende la interacción física entre un antígeno y un anticuerpo dirigido específicamente contra este antígeno. En la presente invención, esta interacción se realiza *in vitro* entre las proteínas NcMIC1, NcMIC3, DHFR, CAT-GFP y los anticuerpos dirigidos específicamente contra cada una de estas proteínas.

50 Por "detección e identificación de anticuerpos" se entiende la detección de anticuerpos específicos para los antígenos deseados presentes en el suero de individuos. La detección de los anticuerpos se realiza mediante ELISA indirecto convencional o técnicas de competición.

Las técnicas de ELISA indirecto se basan en el uso de antígenos fijados en soportes sólidos. El suero de los individuos a diagnosticar se deposita en el soporte para generar interacciones entre el antígeno fijo y los anticuerpos opcionalmente presentes en el suero de los individuos a diagnosticar. Después del lavado, la interacción antígeno-anticuerpo se demuestra usando anticuerpos secundarios marcados que reconocen específicamente los anticuerpos

conjugados anti-especie. La detección de anticuerpos dirigidos contra las proteínas DHFR y/o CAT-GFP permitirá demostrar una inoculación más temprana de las cepas mutantes al individuo. Por el contrario, la detección de anticuerpos dirigidos contra las proteínas NcMIC1 y NcMIC3 revelará una contaminación previa del individuo por una cepa silvestre de *N. caninum*.

5 El ELISA de competición se basa en la competencia entre los anticuerpos opcionalmente presentes en el suero del individuo a diagnosticar y los anticuerpos presentes en un suero de detección. Los antígenos se fijan sobre soportes sólidos. El suero de los individuos a diagnosticar y el suero de competición se depositan en el soporte. La unión específica del anticuerpo de detección se demuestra usando un conjugado antiespecies apropiado y marcado. La posible presencia de anticuerpos en el suero del individuo a diagnosticar genera una competencia con los anticuerpos
10 presentes en el suero de detección y provoca una disminución en la revelación. El ELISA indirecto con las proteínas DHFR y/o CAT-GFP permitirá demostrar la inoculación de las cepas mutantes de la invención con el animal. El ELISA indirecto con las proteínas NcMIC1 y NcMIC3 permitirá resaltar la contaminación del animal por una cepa silvestre de *N. caninum*.

15 La presente descripción también desvela un procedimiento para resaltar, en una muestra biológica seleccionada en particular entre el grupo constituido por sangre y suero, pero también ciertos tejidos y órganos como la placenta, cerebro, músculos, etc. de un mamífero, antígeno NcMIC1 y/o antígeno NcMIC3 y/o antígeno DHFR y/o antígeno CAT-GFP, comprendiendo dicho procedimiento la siguiente etapa:

- determinación de la presencia de al menos un antígeno en una muestra biológica previamente tomada de un mamífero por formación *in vitro* de un complejo inmune, estando dicho complejo inmune constituido por la proteína NcMIC1 unida al anticuerpo anti-NcMIC1 o proteína NcMIC3 unida al anticuerpo anti-NcMIC3 o proteína DHFR unida al anticuerpo anti-DHFR o proteína CAT-GFP unida al anticuerpo anti-CAT-GFP, por comparación con una muestra biológica de referencia.
20

La presente descripción desvela un procedimiento para demostrar los antígenos NcMIC1 y/o NcMIC3 y/o DHFR y/o CAT-GFP y anticuerpos anti-NcMIC1 y/o anti-NcMIC3 y/o anti-DHFR y/o anti-CAT-GFP.

25 Por "detección del agente infeccioso con tecnologías inmunológicas" se entiende todas las técnicas que hacen posible detectar proteínas antigénicas específicas para cepas de tipo silvestre de *N. caninum* (es decir, proteínas NcMIC1 y NcMIC3) y proteínas específicas para las cepas mutantes de la invención (es decir, proteínas DHFR y/o CAT-GFP).

30 La detección de proteínas antigénicas puede ser el resultado de experimentos de inmunohistoquímica, inmunotransferencia, procedimiento de inmunoenzimático con captura de antígeno (ELISA), inmunocromatografía o proteómica bien conocida por el experto en la materia. Estos ensayos se pueden realizar a partir de diferentes muestras biológicas.

35 Por "inmunohistoquímica", se entiende la detección de antígenos en tejidos fijos usando anticuerpos dirigidos específicamente contra el antígeno y marcados. La inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para las proteínas DHFR y/o CAT-GFP permitirá demostrar la inoculación de las cepas mutantes de la invención en animales. La inmunohistoquímica con anticuerpos específicos para las proteínas NcMIC1 y NcMIC3 permitirá demostrar la contaminación del animal con una cepa silvestre de *N. caninum*.

40 Por "inmunotransferencia", se entiende la detección de antígenos en muestras biológicas después de la separación de las proteínas de la muestra por electroforesis en gel y revelación con anticuerpos dirigidos específicamente contra el antígeno y marcados. La inmunotransferencia con anticuerpos específicos para las proteínas DHFR y/o CAT-GFP permitirá demostrar la inoculación de las cepas mutantes con el animal. La inmunotransferencia con anticuerpos específicos para las proteínas NcMIC1 y NcMIC3 permitirá demostrar la contaminación del animal con una cepa silvestre.

45 Por "procedimiento de inmunoensayo enzimático con captura de antígeno (ELISA)" se entiende la detección de antígenos usando anticuerpos de captura dirigidos específicamente contra el antígeno y fijados en una placa sólida (tipo sándwich ELISA indirecto). El antígeno presente en la muestra es capturado por el anticuerpo específico y luego su presencia es revelada por un segundo anticuerpo marcado. El ELISA con anticuerpos específicos para las proteínas DHFR y/o CAT-GFP permitirá demostrar la inoculación de las cepas mutantes de la invención en animales. El ELISA con anticuerpos específicos para las proteínas NcMIC1 y NcMIC3 permitirá demostrar la contaminación del animal con una cepa silvestre de *N. caninum*.

50 Por "inmunocromatografía" se entiende un procedimiento para la detección de antígenos basado en la purificación de la muestra por cromatografía de afinidad usando un anticuerpo específico para el antígeno marcado y fijado en una columna de cromatografía. La inmunocromatografía con anticuerpos específicos para las proteínas DHFR y/o CAT-GFP permitirá demostrar la inoculación de las cepas mutantes de la invención en animales. La inmunocromatografía con anticuerpos específicos para las proteínas NcMIC1 y NcMIC3 permitirá demostrar la contaminación del animal con una cepa silvestre de *N. caninum*.
55

Por "detección del agente infeccioso con tecnologías moleculares" se entiende técnicas de biología molecular bien conocidas por el experto en la materia para identificar la presencia de secuencias de nucleótidos específicas de cepas

de tipo silvestre y cepas mutantes y en particular por reacción de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real, mediante diagnóstico de polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) que puede unirse a procedimientos de PCR o mediante diagnósticos usando sondas nucleicas.

5 La descripción desvela un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada entre el grupo que comprende SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 o sus secuencias complementarias.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	n.º de secuencia
ATG Ncmic1	ATGGGCCAGTCGGTGGTTTT	SEQ ID NO: 35
ATG Ncmic3	ATGCGTGGCGGGGCGTCCGC	SEQ ID NO: 36
ATG DHFR	ATGCAGAAACCGGTGTGTC	SEQ ID NO: 37
ATG CATGFP	ATGCATGAGAAAAAATCACTG	SEQ ID NO: 38
Ncmic1 de parada	TTACAATTCAGATTCACCCG	SEQ ID NO: 39
Ncmic3 de parada	TTATCGAGCCGTTCCGCATTTG	SEQ ID NO: 40
DHFR de parada	CTAGACAGCCATCTCCATCTG	SEQ ID NO: 41
CATGFP de parada	TTAATCGAGCGGGTCCTGGT	SEQ ID NO: 42
Olig 1	CAGATGGAGATGGCTGTCTAG	SEQ ID NO: 43
Olig 2	CGCTTTCGTTCTGATTGACA	SEQ ID NO: 44
Olig 3	AAAACCACCGACTGGCCCAT	SEQ ID NO: 45
Olig 4	TCCTCTCGTTGTTGGAAGCT	SEQ ID NO: 46
Olig 5	TAGCACGGGAAAGGATTGAC	SEQ ID NO: 47
Olig 6	CAAGATCCGCCACAACATC	SEQ ID NO: 48
ORF CATGFP F3	TTCATCATGCCGTTTGTGAT	SEQ ID NO: 49

15 Por "oligonucleótido", se entiende una secuencia de ácidos nucleicos que puede usarse como cebador en un proceso de amplificación o como sonda en un procedimiento de detección. En la presente invención, los oligonucleótidos consisten en una secuencia de al menos 15, preferentemente 20 nucleótidos, y preferentemente menos de 30 nucleótidos, capaz de hibridarse con una molécula de ADN genómico o un ADN complementario. Por "hibridación", se entiende la interacción física existente entre dos moléculas de ácido nucleico. Esta hibridación puede implicar homodúplex ADN/ADN o ARN/ARN o heterodúplex ADN/ARN.

20 Por "ácido nucleico", se entiende una sucesión de nucleótidos unidos por enlaces fosfodiéster. Una molécula de ácido nucleico puede ser lineal, circular, monocatenaria, bicatenaria, parcialmente bicatenaria. Las secuencias de ácidos nucleicos se describen en la presente invención según la práctica bien conocida por el experto en la materia, es decir, se definen mediante una secuencia numerada según la dirección 5' a 3'.

25 Por "secuencias complementarias", se entiende dos secuencias de ácidos nucleicos que tienen nucleótidos complementarios que pueden interactuar entre sí por medio de enlaces de hidrógeno. Delante de una adenina, siempre hay una timina o un uracilo (en el caso de un heterodúplex ADN/ARN); delante de una citosina, siempre hay una guanina. A modo de ejemplo, y sin que esto limite el alcance de la invención, la secuencia 5' ATCG 3' y la secuencia 5' CGAT 3' son complementarias.

La descripción también desvela los pares de oligonucleótidos que consisten en los pares de secuencias seleccionadas entre:

- SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 46,
- 30 - SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 24,
- SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 24,

- SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 24,
- SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 24,
- SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 24,
- 5 - SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 6,
- SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 14,
- SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 14,
- 10 - SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 12,
- SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 14,
- SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 6,
- 15 - SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 14,
- SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 14,
- SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 14,
- 20 - SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 14,
- SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 14,
- SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 42,
- SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 24,
- 25 - SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 24,
- SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 24,
- SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24,
- SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 24,

o sus secuencias complementarias.

- 30 Por "par de oligonucleótidos", se entiende dos nucleótidos tal como se definen por sus secuencias.

Otro objeto de la descripción es proponer conjuntos de oligonucleótidos que consisten en las tríadas de secuencias seleccionadas entre:

- SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 36,
- SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 16,
- 35 - SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47,
- SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 48,

o sus secuencias complementarias.

Para cada tríada, las 2 primeras SEQ ID corresponden a los cebadores y la tercera corresponde a la secuencia de la sonda.

- 40 Por "conjuntos de oligonucleótidos", se entiende grupos de tres oligonucleótidos como se definen por sus secuencias respectivas.

Las cepas silvestres de *Neospora caninum* tienen en su genoma los genes *ncmic1* y *ncmic3*.

- 45 El análisis, en una muestra biológica de la presencia y/o nivel de expresión de los cuatro genes *ncmic1*, *ncmic3*, *dhfr*, *cat-gfp* permite determinar si el animal porta una cepa de *Neospora caninum* resultante de la infección con una cepa silvestre o resultante de la vacunación con una de las tres cepas mutantes como se describe en la presente invención. El objeto es poder establecer un diagnóstico diferencial que permita discriminar, dentro de un rebaño, animales vacunados de animales no vacunados y/o infectados.

- 50 La descripción también desvela el uso de al menos un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada entre el grupo que comprende SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 o sus secuencias complementarias,
- 55 para la detección de genes *ncmic1*, y/o *ncmic3*, y/o *dhfr*, y/o *cat-gfp* del genoma de cepas silvestres y/o cepas mutantes Neo *ncmic1* KO y/o Neo *ncmic3* KO y/o Neo *ncmic1-3* KO de *Neospora caninum*.

La descripción desvela el uso de al menos un oligonucleótido que consiste en la secuencia seleccionada entre SEQ

ID NO: 21, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 o su secuencia complementaria, como cebador para la hibridación y opcionalmente la amplificación del gen *ncmic1* del genoma de cepas de tipo silvestre y/o de la cepa mutante Neo *ncmic3* KO de *Neospora caninum*.

5 La descripción desvela el uso de oligonucleótidos que consisten en al menos un par de secuencias seleccionadas entre: SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 27 y SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47 y SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26 y SEQ ID NO: 24, o sus secuencias complementarias, como cebadores para realizar una hibridación y opcionalmente una amplificación del gen *ncmic1* del genoma de cepas de tipo silvestre y/o cepa mutante Neo *ncmic3* KO de *Neospora caninum*.

15 La descripción desvela el uso de al menos un oligonucleótido que consiste en la secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 40, o su secuencia complementaria, como cebador para la hibridación y opcionalmente la amplificación del gen *ncmic3* del genoma de cepas de tipo silvestre y/o de la cepa mutante Neo *ncmic1* KO de *Neospora caninum*.

20 La descripción desvela el uso de oligonucleótidos que consisten en al menos un par de secuencias seleccionadas entre SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 36 y SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 14, o sus secuencias complementarias, como cebadores para realizar una hibridación y opcionalmente una amplificación del gen *ncmic3* del genoma de cepas de tipo silvestre y/o cepa mutante Neo *ncmic1* KO de *Neospora caninum*.

30 La descripción desvela el uso de al menos un oligonucleótido que consiste en la secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, o su secuencia complementaria, como cebador para la hibridación y opcionalmente la amplificación del gen de selección *dhfr* del genoma de cepas mutantes Neo *ncmic3* KO y/o Neo *ncmic1-3* KO de *Neospora caninum*.

35 La descripción desvela el uso de oligonucleótidos que consisten en al menos un par de secuencias seleccionadas entre: SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 11 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 37 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 16 y SEQ ID NO: 14, o sus secuencias complementarias, como cebadores para realizar una hibridación y opcionalmente una amplificación del gen de selección *dhfr* del genoma de cepas mutantes Neo *ncmic3* KO y/o Neo *ncmic1-3* KO de *Neospora caninum*.

45 La descripción desvela el uso de al menos un oligonucleótido que consiste en la secuencia seleccionada entre SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49 o su secuencia complementaria, como cebador para la hibridación y opcionalmente la amplificación del gen de selección *cat-gfp* del genoma de cepas mutantes Neo *ncmic1* KO y/o Neo *ncmic1-3* KO de *Neospora caninum*.

50 La descripción desvela el uso de oligonucleótidos que consisten en al menos un par de secuencias seleccionadas entre: SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 21 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 38 y SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 29 y SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 48 y SEQ ID NO: 24, o sus secuencias complementarias, como cebadores para realizar una hibridación y opcionalmente una amplificación del gen de selección *cat-gfp* del genoma de cepas mutantes Neo *ncmic1* KO y/o Neo *ncmic1-3* KO de *Neospora caninum*.

Por "amplificación", se entiende el aumento de la concentración de una secuencia de ADN específica entre una mezcla

de secuencias de ADN. Las técnicas de amplificación de ADN son técnicas bien conocidas por el experto en la materia.

La descripción también desvela el uso de al menos un oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada entre el grupo que comprende SEQ ID NO: 35 a 42, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, o su secuencia complementaria, como sonda para hibridación con un ácido nucleico del genoma de cepas de tipo silvestre y/o cepas mutantes Neo *ncmic1* KO y/o Neo *ncmic3* KO y/o Neo *ncmic1-3* KO de *Neospora caninum*.

La descripción también desvela el uso del oligonucleótido que consiste en una secuencia de ácidos nucleicos seleccionada entre el grupo que comprende SEQ ID NO: 35 a 42, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, o su secuencia complementaria, estando dicho oligonucleótido arcado en un extremo por un fluoróforo y opcionalmente en el otro extremo por un inhibidor.

Por "fluoróforo", se entiende las moléculas capaces de emitir luz cuando son excitadas por una fuente de luz. Los fluoróforos son moléculas bien conocidas por el experto en la materia, de los cuales los más usados son Fam, Tet, Hex, Tamra, Rojo Texas, Cy3, Cy5. Este listado no exhaustivo pretende ilustrar el concepto de fluoróforo, pero de ninguna manera debe restringir la presente invención al uso de estos únicos fluoróforos.

Por "inhibidor", se entiende una especie química, capaz de desactivar un estado excitado creado en una entidad molecular por transferencia de energía, electrón o por un mecanismo químico. Los inhibidores son moléculas bien conocidas por el experto en la materia, de los cuales los más usados son Dabcyl, inhibidor Eclipse Dark, inhibidor Black Hole. Un fluoróforo también puede servir como inhibidor. Para esto, el espectro de emisión del fluoróforo injertado en 5' no debe superponerse al espectro de excitación del fluoróforo-inhibidor injertado en 3'. Este listado no exhaustivo está destinada a ilustrar el concepto de inhibidor, pero de ninguna manera debe restringir la presente invención al uso de estos inhibidores.

En la presente invención, las sondas usadas pueden encajar en la definición de tecnología Taqman, FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer), Sonda Molecular o Scorpion o cualquier otra tecnología de PCR en tiempo real (o RT-PCR) bien conocida por el experto en la materia.

La descripción también desvela un procedimiento para detectar *Neospora caninum* por amplificación *in vitro* a partir de una muestra biológica, comprendiendo dicho procedimiento comprende las etapas de:

- poner en contacto el conjunto de oligonucleótidos como se definió anteriormente con una muestra biológica, o un ácido nucleico derivado de la muestra biológica anterior, en condiciones que permitan que los oligonucleótidos se hibriden a un ácido nucleico de *Neospora caninum* presente en la muestra anterior,
- amplificación del ácido nucleico de *Neospora caninum* usando los oligonucleótidos como cebadores,
- detección del producto de amplificación que caracteriza la presencia de *Neospora caninum* en la muestra.

El procedimiento de detección puede implementarse en una muestra biológica seleccionada entre el grupo constituido por sangre, suero o plasma pero también ciertos tejidos y órganos como placenta, cerebro, músculos, etc.

En el procedimiento de detección de *Neospora caninum*, el ácido nucleico de *Neospora caninum* se amplifica por PCR. La PCR puede ser cualitativa, cuantitativa o semicuantitativa. Dependiendo de si se usa o no una sonda de detección, se habla de PCR en tiempo real o PCR clásica.

En el procedimiento de detección de *Neospora caninum*, la detección del producto de amplificación se realiza usando al menos uno de los oligonucleótidos de secuencia SEQ ID NO: 35 a 42, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, o su secuencia complementaria, o cualquier otro oligonucleótido de secuencia incluido en el del amplicón obtenido a partir de los cebadores que han permitido la amplificación del fragmento génico de interés, marcado en un extremo por un fluoróforo y en el otro extremo por un inhibidor como sonda.

La descripción también desvela un kit de amplificación de *Neospora caninum* a partir de una muestra biológica, comprendiendo dicho kit uno de los conjuntos de oligonucleótidos anteriores, o sus secuencias complementarias, y medios para amplificar un ácido nucleico de *Neospora caninum*.

Según una realización particular, dicho kit de amplificación comprende:

- al menos un conjunto de oligonucleótidos que consiste en los oligonucleótidos de secuencias
 - SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 12 y SEQ ID NO: 36,
 - SEQ ID NO: 43 y SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 16,
 - SEQ ID NO: 45 y SEQ ID NO: 46 y SEQ ID NO: 47,
 - SEQ ID NO: 23 y SEQ ID NO: 30 y SEQ ID NO: 48, y
- un medio para amplificar un ácido nucleico de *Neospora caninum*,
- opcionalmente un control interno.

Por "medio para amplificar un ácido nucleico", se entiende los dNTP, una Taq polimerasa, sales y tampones que permiten la realización de una PCR.

Por "control interno", se entiende una secuencia nucleica (ADN exógeno) no relacionada con el genoma de *Neospora caninum*, cebadores y una sonda para amplificación y detección de este ADN exógeno. Este control interno se coloca en la mezcla de PCR para la detección de *Neospora caninum* y confirma el funcionamiento correcto de la amplificación.

Las siguientes figuras y ejemplos pretenden ilustrar adicionalmente la descripción o la invención.

5 Figura 1: esta figura ilustra las 2 etapas de recombinación homóloga para obtener la cepa Neo *ncmic1-3* KO. La primera etapa de recombinación homóloga permite la integración del gen que codifica la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) en el locus del gen *ncmic3*. Una selección con pirimetamina amplifica la cepa mutante simple Neo *ncmic3* KO. La cepa Neo *ncmic3* KO obtenida así se usa para la segunda etapa de recombinación homóloga que permite la integración del gen que codifica la proteína quimérica de cloranfenicol-acetil-transferasa/proteína verde fluorescente (CAT-GFP) en el locus del gen *ncmic1*. Una selección con cloranfenicol permite luego amplificar la cepa doble mutante Neo *ncmic1-3* KO.

10 Figura 2-A: esta figura es una representación esquemática del plásmido pNcMic3KO-DHFR. Este plásmido de 11.312 pares de bases comprende el gen de selección *DHFR* flanqueado por regiones homólogas (5HR-NcMic3 y 3HR-NcMic3) de las secuencias que flanquean el gen *ncmic3*, el gen de resistencia a ampicilina (Amp) y el sitio de restricción Not I que permite su linealización.

15 Figura 2-B: esta figura es una representación esquemática del plásmido pNcMic1KO-CAT-GFP. Este plásmido de 10.069 pares de bases comprende el gen de selección CAT-GFP flanqueado por regiones homólogas (3HR-NcMic1 y 5HR-NcMic1) de secuencias que flanquean el gen *ncmic1*, el gen de resistencia a ampicilina (Amp) así como el sitio de restricción Kpn I que permite su linealización.

20 Figura 3-A: esta figura representa los perfiles electroforéticos de los productos de PCR obtenidos respectivamente en la cepa silvestre NC1 de *N. caninum* y en la cepa Neo *ncmic3* KO, usando conjuntos de cebadores de PCR n.º 1, n.º 2 o n.º 3 de la Tabla II que corresponden a las SEQ ID NO: 5 a SEQ ID NO: 10.

25 Figura 3-B: esta figura representa los perfiles electroforéticos de los productos de PCR obtenidos respectivamente en la cepa silvestre NC1 de *N. caninum* y en la cepa Neo *ncmic3* KO, usando los conjuntos de cebadores de PCR n.º 4, n.º 5, n.º 6 o n.º 7 de la Tabla II que corresponden a las SEQ ID NO: 11 a SEQ ID NO: 16.

Figura 4-A: esta figura ilustra el análisis de la detección de la proteína NcMIC3 en la cepa NC1 de tipo silvestre de *N. caninum* por inmunofluorescencia, usando un anticuerpo que reconoce específicamente la proteína NcMIC3. El mismo campo microscópico se visualiza en luz directa (imagen A) o en fluorescencia (imagen B).

30 Figura 4-B: esta figura ilustra el análisis de la detección de la proteína NcMIC3 en la cepa mutante de *N. caninum* Neo *ncmic3* KO por inmunofluorescencia, usando un anticuerpo dirigido específicamente contra la proteína NcMIC3. El mismo campo microscópico se visualiza en luz directa (imagen A) o en fluorescencia (imagen B).

35 Figura 5: esta figura representa los perfiles electroforéticos de los productos de PCR obtenidos respectivamente en la cepa silvestre NC1 de *N. caninum*, en la cepa mutante Neo *ncmic3* KO y en la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO usando los conjuntos de cebadores de PCR n.º 1 a n.º 12 de la Tabla VII que corresponden a las SEQ ID NO: 7 a 16 y a las SEQ ID NO: 21 a 30.

Figura 6: esta figura ilustra el análisis de detección de proteína GFP en cepas mutantes Neo *ncmic3* KO (imágenes A y B) y Neo *ncmic1-3* KO (imagen C y D) por inmunofluorescencia, usando las propiedades fluorescentes de la proteína CAT-GFP. El mismo campo microscópico se visualiza en luz directa (imágenes altas A y C) o en fluorescencia (imágenes bajas B y D).

40 Figura 7: esta figura representa el porcentaje de supervivencia (ordenadas) de ratones Balb/C hembra infectados por vía intraperitoneal con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* (círculos negros) o cepas mutantes Neo *ncmic3* KO (cuadrados negros) y Neo *ncmic1-3* KO (triángulos negros). El eje de abscisas representa el tiempo transcurrido después de la inyección de taquizoítos en ratones (en días).

45 Figura 8: esta figura representa el porcentaje de supervivencia (ordenadas) de ratones Balb/C hembra después de la vacunación con dosis crecientes de la cepa mutante *ncmic1-3* KO y estimulación 4 meses después de la vacunación, con una dosis letal de cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*. En el eje de abscisas se representan seis lotes de ratones:

Lote i: los ratones Balb/C hembra de este lote se vacunaron por vía intraperitoneal con 5×10^6 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO luego estimuladas por vía intraperitoneal con 2×10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote ii: los ratones Balb/C hembra de este lote se vacunaron por vía intraperitoneal con 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO luego estimuladas por vía intraperitoneal con 2×10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote iii: los ratones Balb/C hembra de este lote se vacunaron por vía intraperitoneal con una primera dosis de 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, luego, un mes después, una segunda dosis de 10^7

taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, luego estimuladas por vía intraperitoneal con 2×10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote iv: los ratones Balb/C hembra de este lote se vacunaron por vía intraperitoneal con 5×10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO luego estimuladas por vía intraperitoneal con 2×10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote v: los ratones Balb/C hembra de este lote se vacunaron por vía intraperitoneal con 10^8 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO luego estimuladas por vía intraperitoneal con 2×10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote vi: los ratones Balb/C hembra de este lote no se vacunaron con taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO pero se estimularon por vía intraperitoneal con 2×10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Figura 9: esta figura ilustra la posición de los cebadores nucleicos usados en la descripción o la invención para detectar la presencia de los cuatro genes *ncmic3*, *dhr*, *ncmic1*, *cat-gfp* en cepas silvestres y/o cepas mutantes de Neo *ncmic1* KO y/o Neo *ncmic3* KO y/o Neo *ncmic1-3* KO de *Neospora caninum*. Los números representan la numeración de las secuencias de cebadores definidas en la presente descripción.

Figura 10: esta figura representa los resultados de los ensayos ELISA realizadas para analizar los anticuerpos IgG anti-N. *caninum* (densidad óptica a 405 nm en ordenadas), presentes en los sueros de ratones vacunados 30 días antes con la cepa Neo *ncmic1-3* KO o no vacunados. En el eje de abscisas se representan cuatro lotes de ratones:

Lote i: las ratas hembras de este lote se vacunaron con los taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3*KO.

Lote ii: las hembras de este lote no se vacunaron y no tienen tratamiento para la neosporosis.

T+: un ratón infectado por *N. caninum* y que presenta anticuerpos anti-N. *caninum* en su suero. Este ratón sirve como control positivo.

T-: un ratón sin tratamiento que no presenta anticuerpos IgG anti-N. *caninum* en su suero. Este ratón sirve como control negativo.

Figura 11: esta figura representa los resultados de los ensayos ELISA realizados para dosificar los anticuerpos IgG1 (histograma gris oscuro) e IgG2A (histograma gris claro) anti-N. *caninum* (densidad óptica a 405 nm en ordenadas), presentes en los sueros de los ratones vacunados 30 días antes con la cepa Neo *ncmic1-3* KO (12 ratones incluidos en este análisis) o no (2 ratones incluidos en este análisis). en el eje de abscisas se representan dos lotes de ratones:

Lote i: las ratas hembras de este lote se vacunaron con los taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3*KO.

Lote ii: las hembras de este lote no se vacunaron y no tienen tratamiento para la neosporosis.

Figura 12-A: esta figura representa la evolución de la temperatura rectal media en grados celsius (ordenadas) de las ovejas de D-5 a D14 después de la vacunación (en abscisas). En esta figura se representan cuatro lotes:

Lote i: (curva gris discontinua - círculo gris) las ovejas hembra de este lote no se vacunaron con taquizoítos de cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO pero se fecundaron, luego se estimularon a la mitad de la gestación, por vía subcutánea con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote ii (curva negra continua - cuadrado negro): las ovejas hembra de este lote se vacunaron por vía subcutánea con una primera dosis de 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, luego, un mes después, una segunda dosis de 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO. Las ovejas se fecundaron 2 meses después de la primera vacunación, luego se estimularon, a la mitad de la gestación, por vía subcutánea con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 *Neospora caninum*.

Lote iii (curva gris continua - triángulo gris): las ovejas hembra de este lote se vacunaron por vía subcutánea con una dosis de 10^8 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO. Las ovejas se fecundaron 2 meses después de la vacunación, luego se estimularon, a la mitad de la gestación, por vía subcutánea con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote iv (curva negra discontinua - cruz negra): las ovejas hembra de este lote no se vacunaron con los taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO ni se estimularon con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*. Se fecundaron al mismo tiempo que las ovejas del lote (i), (ii) y (iii).

Figura 12-B: esta figura representa la evolución de la temperatura rectal media en grados centígrados (ordenadas) de las ovejas de D-1 a D9 después de la estimulación (en abscisas). En esta figura se representan cuatro lotes:

Lote i: (curva gris discontinua - círculo gris) las ovejas hembra de este lote no se vacunaron con taquizoítos de cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO pero se fecundaron, luego se estimularon a la mitad de la gestación, por vía subcutánea con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote ii (curva negra continua - cuadrado negro): las ovejas hembra de este lote se vacunaron por vía subcutánea con una primera dosis de 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, luego, un mes después, una segunda dosis de 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO. Las ovejas se fecundaron 2 meses después de la primera vacunación, luego se estimularon, a la mitad de la gestación, por vía subcutánea con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 *Neospora caninum*.

Lote iii (curva gris continua - triángulo gris): las ovejas hembra de este lote se vacunaron por vía subcutánea con una dosis de 10^8 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO. Las ovejas se fecundaron 2 meses después de la vacunación, luego se estimularon, a la mitad de la gestación, por vía subcutánea con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote iv (curva negra discontinua - cruz negra): las ovejas hembra de este lote no se vacunaron con los taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO ni se estimularon con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*. Se fecundaron al mismo tiempo que las ovejas del lote (i), (ii) y (iii).

Figura 13: esta figura representa los promedios de los resultados de los ensayos ELISA (densidad óptica a 405 nm en ordenadas), realizados a partir de sueros de ovejas el día de la vacunación del lote (ii) y (iii) (D0), el día del refuerzo del lote (ii) (D22), 57 días después de la primera vacunación (D57), 107 días después de la primera vacunación (D107), el día de la estimulación (D0 Est), 29 días después de la estimulación (D29 Est) y 62 días después de la estimulación (D62 Est). En esta figura se representan cuatro lotes en abscisas:

Lote I: Las ovejas hembra de este lote no se vacunaron con los taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO pero se fecundaron, luego se estimularon a la mitad de la gestación, por vía subcutánea con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote II: Las ovejas hembra de este lote se vacunaron por vía subcutánea con una primera dosis de 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, luego, un mes después, una segunda dosis de 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO. Las ovejas se fecundaron 2 meses después de la primera vacunación, luego se estimularon, a la mitad de la gestación, por vía subcutánea con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote iii: las ovejas hembra de este lote se vacunaron por vía subcutánea con una dosis de 10^8 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO. Las ovejas se fecundaron 2 meses después de la vacunación, luego se estimularon, a la mitad de la gestación, por vía subcutánea con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

Lote iv: Las ovejas hembra de este lote no se vacunaron con los taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO ni se estimularon con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*. Se fecundaron al mismo tiempo que las ovejas del lote (i), (ii) y (iii).

Figura 14: esta figura representa los perfiles electroforéticos de los productos de PCR obtenidos respectivamente de cerebros de ratones infectados con *Neospora caninum* o de cerebros de ratones vacunados con la cepa Neo *ncmic3* KO, usando conjuntos de cebadores de PCR n.º 1 (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8), n.º 2 (SEQ ID NO: 9 y SEQ ID NO: 10), n.º 3 (SEQ ID NO: 39 y SEQ ID NO: 25) o n.º 4 (SEQ ID NO: 49 y SEQ ID NO: 42) definidos en la Tabla XVI.

Ejemplos

Para desarrollar la cepa de *N. caninum* invalidada para los genes *ncmic1* y *ncmic3*, se realizaron dos etapas de recombinación homóloga. La primera etapa de la recombinación homóloga permite obtener un mutante simple KO (cepa Neo *ncmic3* KO). La segunda etapa de la recombinación homóloga se realiza en la cepa Neo *ncmic3* KO para obtener una cepa con doble delección (Neo *ncmic1-3* KO) (Figura 1).

Ejemplo 1: Construcción de la cepa mutante Neo *ncmic3* KO

La haploidía del genoma de *Neospora caninum* durante la fase proliferativa permite la invalidación de un gen en una única recombinación homóloga.

Todos los taquizoítos de la cepa NC1 de *Neospora caninum* usados se produjeron en fibroblastos humanos (HFF) cultivados en medio mínimo de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg de estreptomina. Se cosecharon después de la lisis mecánica de las células huésped y 3 pases en una jeringa de 25G.

a) Construcción del plásmido pNcMic3KO-DHFR

El plásmido **pNcMic3KO-DHFR** (Figura 2-A) contiene el gen de selección *DHFR* (dihidrofolato reductasa) que confiere resistencia a pirimetamina (Donald y col., PNAS, 1993, 90 (24): 11703-11707). El gen de selección *DHFR* se coloca bajo el control del promotor *tgdhfr* de *Toxoplasma gondii* (promotor *tgdhfr*) para permitir la expresión del gen en el parásito. La eficacia de este promotor heterólogo se ha demostrado previamente en *N. caninum*. Este casete está flanqueado por las regiones homólogas (5HR-NcMic3 y 3HR-NcMic3) de las secuencias que flanquean el gen *ncmic3*. El casete de selección DHFR permite hacer una selección con pirimetamina.

La región 5'UTR del gen *ncmic3* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de la cepa NC1 de *Neospora caninum*. Para amplificación, los cebadores 5 HR NcMic3 F KpnI y 5 HR NcMic3 R ClaI (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2) permiten la amplificación de la región 5'UTR del gen *ncmic3* y la creación de dos sitios de restricción que se usaron para clonar el fragmento 5HR cadena arriba del casete de selección DHFR en el plásmido pT230 DHFR (KpnI en 5' y ClaI en 3' del fragmento de PCR).

- 5 La región 3'UTR del gen *ncmic3* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de la cepa NC1 de *Neospora caninum*. Para amplificación, los cebadores 3 HR NCmic3 F XbaI y 3 HR NCmic3 R NotI (SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 4) permiten la amplificación de la región 3'UTR del gen *ncmic3* y la creación de dos sitios de restricción que se usaron para clonar el fragmento 3HR cadena abajo del casete de selección DHFR en el plásmido pT230 5HR-NCmic3-DHFR (XbaI en 5' y NotI en 3' del fragmento de PCR). Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla I a continuación.

Tabla I: Listado de cebadores usados para integrar las secuencias 5'UTR y 3'UTR del gen *ncmic3*. Las secuencias del sitio de restricción están subrayadas.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	n.º de secuencia
5 HR NCmic3 F KpnI	CGCGGT <u>ACCCATGTGAATATGCTTTA</u> ACCGTGAC	SEQ ID NO: 1
5 HR NCmic3 R ClaI	CGC <u>ATCGATGAGCTATAACCCTTGGAAATGACTC</u>	SEQ ID NO: 2
3 HR NCmic3 F XbaI	CGCTCTAGACATGCTGATGAAGAAGGGAAAGT	SEQ ID NO: 3
3 HR NCmic3 R NotI	CGCGCGGCCGCTCTCTCCTGAAGTCTTCGAGACC	SEQ ID NO: 4

b) Condiciones de electroporación y selección

- 10 50 µg del plásmido pNcMic3KO-DHFR purificado y luego linealizado por *NotI* se añadieron a 5×10^7 taquizoítos NC1 de *Neospora caninum* suspendidos en el medio de electroporación CYTOMIX que contiene ATP (3 mM) y glutatión (3 mM) (Van den Hoff y col., Nucleic Acid Research, 11 de junio; 20(11): 2902), y la electroporación se realizó en una placa de separación de 4 mm, en un volumen de 800 µl en un dispositivo BioRad (Parámetros: 2000 V, 50 ohmios, 25 µF, con dos descargas eléctricas).
- 15 Después de la electroporación, los taquizoítos se depositaron en una monocapa de células HFF en cultivo. Para la selección de mutantes, el medio de cultivo se reemplaza y se suplementa con el agente de selección (pirimetamina 2 µM), 24h después de la electroporación. En el cultivo se realizan tres pases en este medio.
- 20 Después de 16 días de selección, los parásitos resistentes se clonan limitando la dilución en pocillos de placas de células HFF de 96 pocillos. Después de la amplificación, se buscan los intervalos de lisis causados por el parásito. Los parásitos se trasplantan y su ADN genómico se extrae para análisis de PCR. Estos análisis de PCR deben confirmar la integración del transgén pero también deben permitir diferenciar los parásitos que integraron el transgén de manera aleatoria de parásitos de interés cuyo gen *ncmic3* se eliminó efectivamente por recombinación homóloga.

c) Análisis de PCR

A partir del ADN genómico, se realizaron PCR para:

- 25 • estudiar el tamaño del fragmento de ADN amplificado con un conjunto de cebadores de la PCR n.º 1: HR NCmic3 F (SEQ ID NO: 5) y HR NCmic3 R (SEQ ID NO: 6), presente en las secuencias homólogas. Con una integración aleatoria del transgén, se amplifican dos fragmentos de ADN de 2163 pb y 3824 pb mientras que con recombinación homóloga, solo se amplifica un fragmento de 3824 pb. Con las cepas silvestres, solo se amplifica un fragmento de 2163 pb.
- 30 • verificar la presencia/ausencia del gen *ncmic3* con el conjunto de cebadores de la PCR n.º 2: ORF NCmic3 F (SEQ ID NO: 7) y ORF NCmic3 R (SEQ ID NO: 8).
- y/o verificar la presencia/ausencia del casete *DHFR* con los conjuntos de cebadores de la PCR n.º 3: ORF DHFR F (SEQ ID NO: 9) y ORF DHFR R (SEQ ID NO: 10).

- 35 Las secuencias de los cebadores y el tamaño de los amplicones resultantes de las diferentes PCR se muestran respectivamente en la Tabla II y la Tabla III a continuación.

Tabla II: Listado de cebadores usados para las diferentes PCR de validación de la construcción de la cepa mutante Neo *ncmic3* KO.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	n.º de secuencia	n.º de PCR
HR NCmic3 F	GTCATCGACCGCCGGAAGTAGTAGT	SEQ ID NO: 5	1
HR NCmic3 R	GCAGAGGTTCTGCGTATCTAACACGG	SEQ ID NO: 6	1
ORF NCmic3 F	TTTCCCTTCTAACACAGTCG	SEQ ID NO: 7	2

ORF NCmic3 R	CCTTCAGTGGTTCTCCATGAGT	SEQ ID NO: 8	2
ORF DHFR F	CCTTCTCAGACAACGGGGTA	SEQ ID NO: 9	3
ORF DHFR R	AGATCTTCACGCCCTTCTCA	SEQ ID NO: 10	3
Integ NCmic3 F	GAAAGTGTGAGTGGTAGAGACTGC	SEQ ID NO: 11	4 y 6
ORF NCmic3 R2	CCTTCACTCGAGATCGCGCAAATGAGC	SEQ ID NO: 12	4
ORF DHFR R2	GGACCTCTGTACGAGACATGCCG	SEQ ID NO: 13	6
Integ NCmic3 R	TGTTTACAGGTGATCCAGAAAAGG	SEQ ID NO: 14	5 y 7
ORF NCmic3 F2	GAATTTTGGGACAGGGGAAT	SEQ ID NO: 15	5
ORF DHFR F2	GTCTCTCGTTTTCTCTCTTTTCGG	SEQ ID NO: 16	7

Tabla III: Tamaño de los amplicones (en pares de bases) de las diferentes PCR de validación de la construcción de la cepa mutante Neo *ncmic3* KO.

n.º de PCR	Neo <i>ncmic3</i> KO	<i>Neospora caninum</i> (NC1)
1	3824	2163
2	-	850
3	504	-
4	-	3127
5	-	3374
6	2890	-
7	3258	-

Los perfiles electroforéticos de los productos de PCR se presentan en la Figura 3-A. Entre los clones estudiados, algunos clones tenían una banda específica de *DHFR* (PCR 3) pero no hay una banda específica de *ncmic3* (PCR 2). La PCR n.º 1 realizada en estos clones mostró una banda de 3824 pb específica para un clon Neo *ncmic3* KO.

Se realizaron nuevos análisis de PCR en estos clones de interés con nuevos conjuntos de cebadores. Estas PCR, denominadas de integración, permiten validar la KO genética usando un cebador presente en el genoma cadena arriba o cadena abajo de las secuencias que flanquean el gen *ncmic3* y un segundo cebador presente en el casete de selección (gen *dhfr*) o en el gen de interés (*ncmic3*) (Figura 3-B).

En la figura 3-B, las PCR n.º 4 y n.º 5 permiten mostrar la presencia de *ncmic3* en el locus de *ncmic3*. La PCR n.º 4 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic3 F (SEQ ID NO: 11) y ORF NCmic3 R2 (SEQ ID NO: 12). La PCR n.º 5 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic3 R (SEQ ID NO: 14) y ORF NCmic3 F2 (SEQ ID NO: 15). Se observa la presencia de bandas para la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* y la ausencia de estas bandas para la cepa mutante Neo *ncmic3* KO. En la figura 3-B, las PCR n.º 6 y n.º 7 muestran la presencia de *DHFR* en el locus de *ncmic3*. La PCR n.º 6 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic3 (SEQ ID NO: 11) y ORF DHFR R2 (SEQ ID NO: 13). La PCR n.º 7 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic3 R (SEQ ID NO: 14) y ORF DHFR F2 (SEQ ID NO: 16). Se observa ausencia de bandas para la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* y presencia de bandas para la cepa Neo *ncmic3* KO. Obsérvese la presencia de una banda específica para la PCR n.º 6 a aproximadamente 1000 pb.

El conjunto de resultados de PCR demuestra que la recombinación homóloga ha tenido lugar y que la cepa mutante Neo *ncmic3* KO está bien deletada del gen *ncmic3*.

d) Análisis de inmunofluorescencia

Se realizó un análisis de inmunofluorescencia. 24h antes del análisis de inmunofluorescencia, 5×10^5 los parásitos se depositan en un pozo de p24 que contiene un cubreobjetos cubierto con una capa celular de células HFF.

Las células infectadas con los parásitos se lavan 2 veces con PBS 1X y luego se fijan con paraformaldehído (3,7 % en PBS 1X) durante 30 minutos. Después de 3 lavados con PBS 1X, las células se permeabilizan con solución de Triton (0,1 % en PBS 1X) durante 5 minutos. Después de 3 lavados con PBS 1X, se realiza una etapa de saturación con una solución de PBS 1X/SVF al 10 % durante 30 minutos. Luego, las células se incuban con el anticuerpo primario diluido en una solución de PBS/SVF al 2 % durante 1 hora, se lavan 3 veces y luego se incuban con el anticuerpo secundario diluido en una solución de PBS/SVF al 2 % durante 1 hora. Después de 2 lavados con PBS1X, los cubreobjetos se montan en un portaobjetos con inmount y se observan al microscopio de fluorescencia.

El anticuerpo primario usado es un anticuerpo que permite detectar la expresión de la proteína NcMIC3 en el parásito (anticuerpo primario: anticuerpo de conejo anti-mic3 y anticuerpo secundario comercial: Alexa fluor® 594 cabra anti-conejo, Life technologies ref. A-11012).

Para la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*, se observa fluorescencia roja en el polo apical del parásito que revela la presencia de la proteína NcMIC3 (Figura 4A), mientras que para la cepa mutante Neo *ncmic3* KO, no se observó fluorescencia en el polo apical del parásito demostrando la ausencia de la proteína NcMIC3 (Figura 4B).

Ejemplo 2: Construcción de la cepa mutante Neo *ncmic1* KO

5 a) Construcción del plásmido pNc *mic1*KO-CAT-GFP

El plásmido pNcMic1KO-CAT-GFP (Figura 2-B) contiene un casete de selección CAT-GFP que codifica una proteína de fusión que permite la resistencia al cloranfenicol (CAT) y una fluorescencia verde (GFP: Proteína Verde Fluorescente). Esto se coloca bajo el control del promotor de α -tubulina de *Toxoplasma gondii* para permitir la expresión del gen en el parásito. A ambos lados del casete, las regiones homólogas de las secuencias que flanquean el gen *ncmic1* se clonaron.

La región 3'UTR del gen *ncmic1* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de la cepa NC1 de *Neospora caninum*. Para amplificación, los cebadores 3 HR NCmic1 F KpnI y 3 HR NCmic1 R HindIII (SEQ ID NO: 17 y SEQ ID NO: 18) permiten la amplificación de la región 3'UTR del gen *ncmic1* y la creación de dos sitios de restricción que se usaron para clonar el fragmento 3HR cadena arriba del casete de selección CAT-GFP en el plásmido pT230 CAT-GFP (KpnI en 5' y HindIII en 3' del fragmento de PCR).

La región 5'UTR del gen *ncmic1* se amplificó por PCR a partir del ADN genómico de la cepa NC1 de *Neospora caninum*. Para amplificación, los cebadores 5 HR NCmic1 F BamHI y 5 HR NCmic1 R NotI (SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20) permiten la amplificación de la región 5'UTR de la gen *ncmic1* y la creación de dos sitios de restricción que se usaron para clonar el fragmento 5HR cadena abajo del casete de selección CAT-GFP en el plásmido pT230 3HRNcMic1CAT-GFP (BamHI en 5' y NotI en 3' del fragmento de PCR). Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla IV a continuación.

Tabla IV: Listado de cebadores usados para integrar las secuencias 5'UTR y 3'UTR del gen *ncmic 1*. Las secuencias del sitio de restricción están subrayadas.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	n.º de secuencia
3 HR NCmic1 F KpnI	CGCGGTACCAGGCAGAAGTAAAGA AGGTTCTC	SEQ ID NO: 17
3 HR NCmic 1 R HindIII	CGCAAGCTTTGATCACGCAAGAAA AGAAGC	SEQ ID NO: 18
5 HR NCmic1 F BamHI	CGCGGATCCCATTGTAGATACGGT TGCACAC	SEQ ID NO: 19
5 HR NCmic1 R NotI	CGCGCGGCCGACATTCAGACGGC AGAACTCTG	SEQ ID NO: 20

b) Condiciones de electroporación y selección

25 50 μ g del plásmido pNcMic1KO-CAT-GFP purificado y linealizado por *KpnI* deben añadirse a 5×10^7 taquizoitos NC1 suspendidos en medio de electroporación CYTOMIX que contiene ATP (3 mM) y Glutación (3 mM) (Van den Hoff y col., Nucleic Acid Research, 11 de junio; 20(11):2902), y la electroporación debe realizarse en una placa de separación de 4 mm, en un volumen de 800 μ l en un dispositivo BioRad (Parámetros: 2000 V, 50 ohmios, 25 μ F, con dos descargas eléctricas).

30 Después de la electroporación, los taquizoitos se depositarán en una monocapa de células HFF en cultivo. Para la selección de mutantes, el medio de cultivo será reemplazado y suplementado con el agente de selección (cloranfenicol 50 μ M), 24h después de la electroporación. En este medio se deben realizar tres pases en cultivo.

Después de 15 días de selección, los parásitos resistentes se clonarán limitando la dilución en pocillos de células HFF de 96 pocillos. Después de la amplificación, se investigarán los intervalos de lisis causados por el parásito. Los parásitos se trasplantarán y su ADN genómico se extraerá para análisis de PCR.

c) Análisis de PCR

Las secuencias de los cebadores y el tamaño esperado de los amplicones de las diversas PCR se muestran respectivamente en la Tabla V y la Tabla VI a continuación.

Tabla V: Listado de cebadores usados para diferentes PCR de validación para la construcción de cepas mutantes Neo *ncmic1* KO.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	n.º de secuencia	n.º de PCR
Integ NCmic1 F	CCGAGCAAGTTAGCAAGTCC	SEQ ID NO: 21	1 y 3
ORF CATGFP R	CCGTTTGGTGGATGTCTTCT	SEQ ID NO: 22	1
ORF CATGFP F	GCATCGACTTCAAGGAGGAC	SEQ ID NO: 23	2
Integ NCmic1 R	CTTGTCGGTACATCGTTTG	SEQ ID NO: 24	2 y 4
ORF NCmic1 R	TTCTCCAGGCACTCACCTCT	SEQ ID NO: 25	3
ORF NCmic1 F	AGCTTCCAACAACGAGAGGA	SEQ ID NO: 26	4
ORF NCmic1 F2	CCCAGGATATCGTTTGTTC	SEQ ID NO: 27	5
ORF NCmic1 R2	CTTCTGATGCACGGAAGTGA	SEQ ID NO: 28	5
ORF CATGFP F2	CCTGAAGTTCATCTGCACCA	SEQ ID NO: 29	6
ORFCATGFP R2	GTAGTGGTTGTCGGGCAGCA	SEQ ID NO: 30	6

Tabla VI: Tamaño de los amplicones (en pares de bases) de las diferentes PCR de validación de la construcción de la cepa mutante Neo *ncmic1* KO.

n.º de PCR	Neo <i>ncmic1</i> KO	<i>Neospora caninum</i> (NC1)
1	3359	-
2	3421	-
3	-	3746
4	-	3046
5	-	449
6	472	-

5 **Ejemplo 3: Construcción de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO****a) Construcción del plásmido pNc mic1KO CAT-GFP**

La construcción del plásmido pNcMic1KO-CAT-GFP se describe en el Ejemplo 2 (2a).

b) Condiciones de electroporación y selección

10 50 µg del plásmido pNcMic1KO-CAT-GFP purificado y linealizado por *KpnI* se añadieron a 5x10⁷ taquizoítos Neo *ncmic3* KO suspendidos en el medio de electroporación CYTOMIX que contiene ATP (3 mM) y Glutación (3 mM) (Van den Hoff y col., Nucleic Acid Research, 11 de junio; 20(11): 2902), y la electroporación se realizó en una placa de separación de 4 mm, en un volumen de 800 µl en un dispositivo BioRad (Parámetros: 2000 V, 50 ohmios, 25 µF, con dos descargas eléctricas).

15 Después de la electroporación, los taquizoítos se depositaron en una monocapa de células HFF en cultivo. Para la selección de mutantes, el medio de cultivo se reemplaza y se suplementa con el agente de selección (cloranfenicol 50 µM), 24h después de la electroporación. En el cultivo se realizan tres pases en este medio.

Después de 15 días de selección, los parásitos resistentes se clonan limitando la dilución en pocillos de placas de células HFF de 96 pocillos. Después de la amplificación, se buscan los intervalos de lisis causados por el parásito. Los parásitos se trasplantan y su ADN genómico se extrae para análisis de PCR.

20 **c) Análisis de PCR**

Las secuencias de los cebadores y el tamaño de los amplicones resultantes de las diferentes PCR se muestran respectivamente en la Tabla VII y la Tabla VIII a continuación.

Tabla VII: Listado de cebadores usados para las diferentes PCR de validación para la construcción de cepas mutantes Neo *ncmic3* KO y Neo *ncmic1-3* KO.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	n.º de secuencia	n.º de PCR
Integ NCmic1 F	CCGAGCAAGTTAGCAAGTCC	SEQ ID NO: 21	1 y 3

ES 2 755 952 T3

ORF CATGFP R	CCGTTTGGTGGATGTCTTCT	SEQ ID NO: 22	1
ORF CATGFP F	GCATCGACTTCAAGGAGGAC	SEQ ID NO: 23	2
Integ NCmic1 R	CTTGTCCGTCACATCGTTTG	SEQ ID NO: 24	2 y 4
ORF NCmic1 R	TTCTCCAGGCACTCACCTCT	SEQ ID NO: 25	3
ORF NCmic1 F	AGCTTCCAACAACGAGAGGA	SEQ ID NO: 26	4
Integ NCmic3 F	GAAAGTGTCAGTGGTAGAGACTGC	SEQ ID NO: 11	5 y 7
ORF NCmic3 R2	CCTTCACTCGAGATCGCGCAAATGAGC	SEQ ID NO: 12	5
ORF DHFR R2	GGACCTCTGTACGAGACATGCCG	SEQ ID NO: 13	7
Integ NCmic3 R	TGTTTACAGGTGATCCAGAAAAGG	SEQ ID NO: 14	6 y 8
ORF NCmic3 F2	GAATTTTGGGACAGGGGAAT	SEQ ID NO: 15	6
ORF DHFR F2	GTCTCTCGTTTTCTCTTTTTCGG	SEQ ID NO: 16	8
ORF NCmic1 F2	CCCAGGATATCGTTTGTTC	SEQ ID NO: 27	9
ORF NCmic1 R2	CTTCTGATGCACGGAAGTGA	SEQ ID NO: 28	9
ORF CATGFP F2	CCTGAAGTTCATCTGCACCA	SEQ ID NO: 29	10
ORFCATGFP R2	GTAGTGGTTGTCGGGCAGCA	SEQ ID NO: 30	10
ORF NCmic3 F	TTTCCCTTCTAAACACAGTCG	SEQ ID NO: 7	11
ORF NCmic3 R	CCTTCAGTGGTTCTCCATGAGT	SEQ ID NO: 8	11
ORF DHFR F	CCTTCTCAGACAACGGGGTA	SEQ ID NO: 9	12
ORF DHFR R	AGATCTTCACGCCCTTCTCA	SEQ ID NO: 10	12

Tabla VIII: Tamaño de los amplicones (en pares de bases) de las diferentes PCR de validación para la construcción de cepas mutantes Neo *ncmic3* KO y Neo *ncmic1-3* KO.

n.º de PCR	Neo <i>ncmic1-3</i> KO	<i>Neospora caninum</i> (NC1)	Neo <i>ncmic3</i> KO
1	3359	-	-
2	3421	-	-
3	-	3746	3746
4	-	3046	3046
5	-	3127	-
6	-	3374	-
7	2890	-	2890
8	3258	-	3258
9	-	449	449
10	472	-	-
11	-	850	-
12	504	-	504

En la Figura 5, la PCR n.º 1 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic1 F (SEQ ID NO: 21) y ORF CATGFP R (SEQ ID NO: 22). La PCR 2 se realiza con el conjunto de cebadores ORF CATGFP F (SEQ ID NO: 23) e Integ NCmic1 R (SEQ ID NO: 24). La PCR n.º 3 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic1 F (SEQ ID NO: 21) y ORF NCmic1 R (SEQ ID NO: 25). La PCR n.º 4 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic1 R (SEQ ID NO: 24) y ORF NCmic1 F (SEQ ID NO: 26). La PCR n.º 5 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic3 F (SEQ ID NO: 11) y ORF NCmic3 R2 (SEQ ID NO: 12). La PCR n.º 6 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic3 R (SEQ ID NO: 14) y ORF NCmic3 F2 (SEQ ID NO: 15). La PCR n.º 7 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic3 F (SEQ ID NO: 11) y ORF DHFR R2 (SEQ ID NO: 13). La PCR n.º 8 se realiza con el conjunto de cebadores Integ NCmic3 R (SEQ ID NO: 14) y ORF DHFR F2 (SEQ ID NO: 16). La PCR n.º 9 se realiza con el conjunto de cebadores ORF NCmic1 F2 (SEQ ID NO: 27) y ORF NCmic1 R2 (SEQ ID NO: 28). La PCR n.º 10 se realiza con el conjunto de cebadores ORF CATGFP F2 (SEQ ID NO: 29) y ORF CATGFP R2 (SEQ ID NO: 30). La PCR n.º 11 se realiza con el conjunto de cebadores ORF NCmic3 F (SEQ ID NO: 7) y ORF NCmic3 R (SEQ ID NO: 8). La PCR n.º 12 se realiza con el conjunto de cebadores ORF DHFR F (SEQ ID NO: 9) y ORF DHFR R (SEQ ID NO: 10).

Los análisis electroforéticos de los productos de PCR muestran que la cepa Neo *ncmic1-3* KO ya no tiene genes *ncmic1* y *ncmic3* (pocillos 3, 4, 5, 6, 9 y 11, Figura 5) y tiene los genes *dhfr* y *cat-gfp* (pocillos 1, 2, 7, 8, 10 y 12, Figura 5) validando así la obtención de la cepa Neo *ncmic1-3* KO. El conjunto de resultados de PCR demuestra que sí tuvo lugar una recombinación homóloga y que la cepa Neo *ncmic1-3* KO está bien delecionada de los genes *ncmic1* y *ncmic3*.

d) Análisis de inmunofluorescencia

El análisis de inmunofluorescencia solo se realizó mediante observación directa de la fluorescencia del parásito (Figura 6).

Los parásitos de las dos cepas mutantes se visualizan en luz directa (imágenes A y C). El mismo campo microscópico se visualiza en fluorescencia. La fluorescencia verde, debido a la expresión de la proteína recombinante quimérica CAT-GFP solo se detecta en la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO (imagen D) después de la inserción del casete CAT-GFP. A la inversa, la cepa Neo *ncmic3* KO, que no tiene un casete CAT-GFP, no expresa la proteína CAT-GFP y, por lo tanto, no exhibe fluorescencia (imagen B).

Ejemplo 4: Efectos de la inactivación de la proteína NcMIC3 o las proteínas NcMIC1 y NcMIC3 en las propiedades infecciosas de *Neospora caninum*

Las cepas mutantes Neo *ncmic3* KO y Neo *ncmic1-3* KO descritas en los ejemplos 1 y 3 se mantuvieron mediante pases regulares en células HFF cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Nov; 7 (6) 893-898; y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133 (4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.

Entre el 60 y el 80 % de los ratones Balb/C hembra generalmente mueren entre 8 y 11 días después de una infección intraperitoneal por 10^7 taquizoítos de la cepa NC1 de *Neospora caninum*.

El estudio de la virulencia de mutantes Neo *ncmic3* KO y Neo *ncmic1-3* KO se estudió en un lote mínimo de 10 ratones Balb/C hembra mediante inyección intraperitoneal de 10^7 taquizoítos/ratón. Los controles se realizaron en las mismas condiciones en lotes de 10 ratones Balb/C hembra usando la cepa NC1 de *Neospora caninum*.

La Figura 7 muestra que el 70 % de los ratones infectados con 10^7 taquizoítos de la cepa NC1 de *Neospora caninum* murió 11 días después de la infección (círculos negros). Los ratones infectados con la cepa mutante Neo *ncmic3* KO (cuadrados negros) muestran un retraso en la mortalidad (muerte de los ratones entre 9 días y 17 días después de la infección) y una atenuación significativa de la virulencia del parásito (mortalidad del 30 % en comparación con el 70 % con la cepa silvestre 29 días después infección). Además, en el caso de ratones infectados con cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO (triángulos negros), se observa un 100 % de supervivencia 29 días después de la infección.

Los ratones también se infectaron con cantidades crecientes de la cepa NC1 de *Neospora caninum* y cepas mutantes Neo *ncmic3* KO y Neo *ncmic1-3* KO. La dosis necesaria para causar una mortalidad del 50 % (DL50) es de 6×10^6 taquizoítos para la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* y 22×10^6 taquizoítos para la cepa Neo *ncmic3* KO. Para la cepa Neo *ncmic1-3* KO, la DL50 es muy superior a 10^8 taquizoítos, es decir, 17 veces la DL50 de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*. En efecto, no se observa mortalidad a esta dosis con la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO.

Ejemplo 5: Eficacia de la cepa Neo *ncmic1-3* KO en la prevención de la neosporosis en un modelo de ratón de neosporosis letal

En la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO descrita en el Ejemplo 3 se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Nov; 7 (6) 893-898; y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133 (4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.

Los ratones Balb/C hembra se separaron en 6 lotes distintos: (i) un lote vacunado por vía intraperitoneal con 5×10^6 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, (ii) un lote vacunado por vía intraperitoneal con 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, (iii) un lote vacunado por vía intraperitoneal con 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO y reforzado 1 mes después de la primera inyección con 10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, (iv) un lote vacunado por vía intraperitoneal con 5×10^7 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, (v) un lote vacunado por vía intraperitoneal con 10^8 taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO y (vi) un lote de control no vacunado.

Cuatro meses después de la vacunación, todos los ratones fueron estimulados por vía intraperitoneal con 2×10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*. La cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomicina. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Nov; 7 (6) 893-898; y Bartley y col.,

Parasitology, 2006, Oct; 133 (4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20. La dosis usada para la estimulación es suficiente para causar un 100 % de mortalidad en ratones estimulados. Luego se sigue la supervivencia de los ratones durante un mes.

5 La Figura 8 muestra que los ratones vacunados de los lotes (i) a (iv) están totalmente protegidos contra la reinfección con una cepa virulenta de tipo silvestre NC1 de *Neospora caninum* causando 100 % de mortalidad en ratones de grupo control (vi), todos los cuales mueren el 6° día después de la estimulación. Los ratones vacunados con la dosis más alta de la cepa Neo *ncmic1-3* KO (lote (v)) muestra mortalidad intermedia (50 %). A diferencia de los ratones en el grupo de control (vi), la mortalidad de los ratones de este lote se produce antes (4,5 días como promedio). Esta observación podría explicarse por una fuerte respuesta inflamatoria generada por este grupo de ratones en el momento de la estimulación.

Ejemplo 6: Eficacia de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO en la prevención de la neosporosis en un modelo de ratón de neosporosis congénita - Experimento 1

15 En la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO descrita en el Ejemplo 3 se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Nov; 7 (6) 893-898; y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133 (4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.

Los ratones OF1 hembra se separaron en 2 lotes distintos: (i) un lote vacunado por vía intraperitoneal con 10⁷ taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, (ii) un lote de control no vacunado.

20 Dos meses después de la vacunación, los ratones se pusieron con el macho (D0) a razón de tres ratones hembra para un macho. Los ratones gestantes son diagnosticadas por peso y se estimulan el décimo día de gestación con una estimulación infecciosa por vía intraperitoneal con 2x10⁶ taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*. La cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Nov; 7 (6) 893-898; y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133 (4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.

30 Un día antes del parto, los ratones hembra fueron sacrificados. Las placentas y los fetos se aislaron y el ADN se extrajo. Una PCR anidada se realiza a partir de la región del gen *NC5* de *N. caninum* (Yamage y col., J.Parasitol, abril de 1996, 82(2): 272-9, Baszler y col., J Clin Microbiol, Dic de 1999, 37 (12): 4059-64). Para la PCR primaria, el par de cebadores NC5 FA (SEQ ID NO: 31) y NC5 RA (SEQ ID NO: 32) se usa y el par de cebadores NC5 FB (SEQ ID NO: 33) y NC5 RB (SEQ ID NO: 34) se usa para la PCR secundaria. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla IX a continuación.

35 Tabla IX: Listado de cebadores usados para las PCR de búsqueda de la presencia del parásito *N. caninum* en los tejidos.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	n.º de secuencia	n.º de PCR
NC5 FA	CCAGTGCCTCCAATCCTGTAAC	SEQ ID NO: 31	Primario
NC5 RA	CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT	SEQ ID NO: 32	Primario
NC5 FB	TAATCTCCCCGTCATCAGT	SEQ ID NO: 33	Secundario
NC5 RB	GGGTGAACCGAGGGAGTTG	SEQ ID NO: 34	Secundario

Para cada placenta y feto, se realizan tres PCR independientes. Las placentas y los fetos se consideran positivos cuando *Neospora caninum* se detecta para al menos una PCR. Los resultados se presentan en la Tabla X a continuación.

40 Tabla X: Búsqueda de *Neospora caninum* en los tejidos placentarios y fetales de ratones vacunados con la cepa Neo *ncmic1-3* KO y estimulados con la cepa silvestre NC1 (lote (i)) en comparación con los ratones de control no vacunados y estimulados con la cepa silvestre NC1 (lote (ii)).

Lote (i) Ratones vacunados con 10 ⁷ taquizoítos de la cepa Neo <i>ncmic1-3</i> KO y estimulados con 2.10 ⁶ taquizoítos de la cepa silvestre NC1	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en las placentas		
	Número de placentas estudiadas	Número de placentas positivas	% de placentas positivas
	106	47	44,3 %
	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en los fetos		

	Número de fetos estudiados 109	Número de fetos positivos 23	% de fetos positivos 21,1 %
Lote (ii) Ratones no vacunados y estimulados con 2.10 ⁶ taquizoítos de la cepa silvestre NC1	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en las placentas		
	Número de placentas estudiadas 37	Número de placentas positivas 37	% de placentas positivas 100 %
	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en los fetos		
	Número de fetos estudiados 36	Número de fetos positivos 27	% de fetos positivos 75 %

Estos resultados demuestran que la vacunación con la cepa mutante atenuada Neo *ncmic1-3* KO reduce significativamente la transmisión materno-fetal del parásito, validando la efectividad de la cepa Neo *ncmic1-3* KO para prevenir los efectos nocivos de la neosporosis en un modelo de ratón de neosporosis congénita patógena.

5 Ejemplo 7: Eficacia de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO en la prevención de la neosporosis en un modelo ovino de neosporosis congénita

a) Desarrollo del experimento

La cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO descrita en el Ejemplo 3 se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Nov; 7 (6) 893-898; y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133 (4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.

Las ovejas Romanov seronegativas para *Neospora caninum* y para *Toxoplasma gondii* se separaron en 4 lotes distintos: un lote compuesto por 14 ovejas de control no vacunadas con la cepa mutante Neo *ncmic1-3*KO y estimuladas por vía subcutánea con 10⁷ taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* (lote i), un lote compuesto por 15 ovejas vacunadas por vía subcutánea con 10⁷ taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO después con refuerzo por vía subcutánea 1 mes después de la primera inyección con 10⁷ taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO y estimuladas por vía subcutánea con 10⁷ taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* (lote ii), un lote compuesto por 14 ovejas vacunadas por vía subcutánea con 10⁸ taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO y estimuladas por vía subcutánea con 10⁷ taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* (lote iii) y un lote compuesto por 5 ovejas de control no vacunadas con la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO y no estimuladas con la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* (lote iv).

Dos meses después de la primera vacunación, las ovejas fueron inseminadas artificialmente. Se emprendió un retorno al carnero 3 semanas después de la inseminación artificial. Luego se realizaron ecografías y se diagnosticó que 14 ovejas de 14 estaban preñadas en el lote (i), 13 ovejas de 15 en el lote (ii), 13 ovejas de 14 en el lote (iii) y 4 ovejas de 5 en el lote (iv).

Las ovejas preñadas de los lotes (i), (ii) y (iii) se sometieron a la mitad de la gestación a una estimulación infecciosa con 10⁷ taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*. La cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Nov; 7 (6) 893-898; y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133 (4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.

b) Recuento de temperatura post-inmunización y post-estimulación

Desde 5 días antes de la vacunación hasta 14 días después de la vacunación, las temperaturas rectales de las ovejas se registraron diariamente. Las medias de las temperaturas posteriores a la inmunización de los lotes (i), (ii) (iii) y (iv) se muestran en la Figura 12-A. Las temperaturas de los lotes de control (iii) y (iv) permanecen fisiológicas. En cambio, se observó un pico térmico para los dos lotes vacunados (> 39,5 °C). Se observa un retorno a las temperaturas fisiológicas 5 días después de la inmunización.

El día anterior a la infección y durante los días siguientes, el recuento de la temperatura rectal se hizo diariamente. Las medias de las temperaturas post-infección de los lotes (i), (ii) (iii) y (iv) se muestran en la Figura 12-B. Las temperaturas del lote de control (iv) permanecen fisiológicas. En cambio, se observa un pico térmico para los lotes vacunados (i), (ii) y (iii). Para el único lote de control infectado (lote (i)), el pico febril duró 3 días con un máximo a 40 °C a D3. Para los lotes vacunados (ii) y (iii), el pico febril interviene a partir de J2, dura solo dos días y es menos

intenso (39,5 °C).

c) Análisis de la respuesta inmunitaria humoral

5 La respuesta inmunitaria se estudió post-inmunización y post-estimulación evaluando mediante ELISA la cinética de aparición de las IgG específicas anti-*N. caninum* en el suero de las ovejas de los lotes (i), (ii) (iii) y (iv). Los sueros se toman antes de la inmunización (D0) y luego a D22, D57 y D107 post-vacunación y finalmente después de la estimulación (D0 Est, D29 Est, D62 Est). La sangre se extrae de la vena yugular y la muestra se deja durante la noche a 4 °C para permitir la formación del coágulo. El suero se recupera centrifugando las muestras a 5000 g durante 10 min. El sobrenadante se recupera y se almacena a -20 °C.

10 Para analizar la respuesta inmunitaria humoral inducida después de la vacunación, se prepara un extracto de *N. caninum*. Para la preparación de este extracto parasitario total, los taquizoítos de la cepa NC-1 se lavan, se sonicán dos veces a 60 vatios/s durante 10 min en hielo y se centrifugan a 2000 g durante 30 minutos a +4 °C. El sobrenadante se recupera y la concentración se determina mediante un ensayo de BCA que usa como patrón el suero de albúmina bovina (BSA). Las alícuotas se almacenan a -80 °C hasta su uso.

15 El extracto parasitario total de la cepa NC1 se diluye en un tampón carbonato a pH 9,6 para obtener una concentración final de 10 µg/ml. Las placas se lavan luego tres veces con el tampón de lavado (PBS 1X - Tween 20 al 0,05 %) y luego se saturan durante 1h30 a 37 °C con una solución de PBS 1X - Tween 20 al 0,05 % suplementado con suero de albúmina bovina al 4 % (BSA) (Sigma). Luego se retira el medio. Los sueros para el ensayo se diluyen a 1:50 en una solución de PBS 1X - Tween 20 al 0,05 % y se depositan por duplicado en los pocillos. Después de una hora de incubación a 37 °C y una nueva serie de lavado, el anticuerpo secundario anti-IgG de cordero acoplado a fosfatasa alcalina (Jackson ImmunoResearch 713-055_147, IgG de burro anti-Oveja) y diluido a 1/5000 se deposita a razón de 100 µl por pocillo. Las muestras se incuban luego durante una hora a 37 °C. Después de una nueva serie de tres lavados, la revelación se realiza mediante la adición a cada pocillo de 100 µl de una solución de paranitrofenilfosfato disódico (PnPP) (Sigma) a 1 mg/ml, en un tampón DEA-HCl. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente y protegido de la luz, la absorbancia a 405 nm se mide usando un lector de placas (Multiskan MCC340
20 Wallace). Las medias de los resultados de los ensayos ELISA a D0, D22, D57 y D107 después de la inmunización y a D0, D29, D62 post-estimulación para los sueros de los diferentes lotes de ovejas diluidos a 1/50 se representan en la Figura 13.

25 Después de la inmunización, las ovejas de los lotes de control (i) y (iv) no vacunados no desarrollaron respuesta humoral. En cambio, las ovejas de los lotes (ii) y (iii) desarrollaron una respuesta IgG anti-neosporosis desde D22. Esta respuesta de IgG se estimula durante la segunda vacunación del lote (ii). Luego disminuye para los dos lotes (ii) y (iii).

30 Después de la estimulación, las ovejas del grupo de control (iv) no estimulado no desarrollaron una respuesta humoral. En cambio, las ovejas de los lotes (i) (ii) y (iii) desarrollaron una respuesta IgG anti-neosporosis. La respuesta humoral de los lotes vacunados (ii) y (iii) es más rápida que la del lote no vacunado (i).

35 d) Estudio de abortos

Después de la estimulación, las ovejas fueron monitorizadas diariamente hasta el parto y se registraron abortos y mortalidad.

Los resultados de este estudio se ilustran en la Tabla XV a continuación.

Lotes	Número de corderos esperados (%)	Número de abortos (%)	Número de mortinatos (%)	Número de corderos vivos (%)
(i) (No vacunado/infectado)	35 (100 %)	29 (82,9 %)	1 (2,8 %)	5 (2,8 %)

(continuación)

Lotes	Número de corderos esperados (%)	Número de abortos (%)	Número de mortinatos (%)	Número de corderos vivos (%)
(ii) (vacunado y luego reforzado con 10 ⁷ taquizoítos luego infectado)	38 (100 %)	0 (0 %)	11 (29 %)	27 (71 %)
(iii) (vacunado con 10 ⁸ taquizoítos luego infectado)	33 (100 %)	3 (9,1 %)	8 (24,2 %)	22 (66,6 %)
(iv) (no vacunado/no infectado)	13 (100 %)	0 (0 %)	1 (7,7 %)	12 (92,3 %)

Estos resultados demuestran que la vacunación con la cepa mutante atenuada Neo *ncmic1-3* KO reduce significativamente los efectos nocivos de una infección de un rumiante, especialmente un ovino, por *Neospora caninum*.

5 Ejemplo 8: Análisis de la respuesta inmunitaria humoral después de la vacunación con la cepa Neo *ncmic1-3* KO

La cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO descrita en el Ejemplo 3 se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Nov; 7 (6) 893-898; y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133 (4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.

Los ratones OF1 hembra se separaron en 2 lotes distintos: (i) un lote vacunado por vía intraperitoneal con 5.10⁷ taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO, (ii) un lote de control no vacunado pero estimulado.

Un mes después de la vacunación, se realiza una extracción de sangre submaxilar. La sangre completa se almacena durante 2 horas a 37 °C antes de centrifugarse a 5.000 g durante 10 minutos para conservar el suero. El suero se almacena a -20 °C hasta su uso.

Para analizar la respuesta inmunitaria humoral inducida después de la vacunación, se prepara un extracto de *N. caninum*. Para la preparación de este extracto parasitario total, los taquizoítos de la cepa NC-1 se lavan, se sonicen dos veces a 60 vatios/s durante 10 min en hielo y se centrifugan a 2 000 g durante 30 minutos a +4 °C. El sobrenadante se recupera y la concentración se determina mediante una dosificación BCA que usa como patrón suero de albúmina bovina (BSA). Las alícuotas se almacenan a -80 °C hasta su uso.

A partir de los sueros de ratones vacunados con la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO y ratones no vacunados, los ensayos ELISA se realizan para caracterizar la respuesta inmunitaria humoral inducida por la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO.

25 a) Búsqueda de las IgG totales específicas para *N. caninum*

El extracto parasitario total de la cepa NC1 se diluye en un tampón carbonato a pH 9,6 para obtener una concentración final de 10 µg/ml. Las placas de fondo plano de 96 pocillos se sensibilizan durante la noche a +4 °C depositando en cada pocillo 100 µl de extracto total de *N. caninum*. Las placas se lavan luego tres veces con el tampón de lavado (PBS 1X - Tween 20 al 0,05 %) y luego se saturan durante 1h30 a 37 °C con una solución de PBS 1X - Tween 20 al 0,05 % suplementado con suero de albúmina bovina al 4 % (BSA) (Sigma). Luego se retira el medio. Los sueros para el ensayo se diluyen a 1:50 en una solución de PBS 1X - Tween 20 al 0,05 % y se depositan por duplicado en los pocillos. Después de una hora de incubación a 37 °C y una nueva serie de lavado, el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (Sigma A3562, IgG de cabra anti-ratón) y diluido a 1/5000 se deposita a razón de 100 µl por pocillo. Las muestras se incuban luego durante una hora a 37 °C. Después de una nueva serie de tres lavados, la revelación se realiza mediante la adición a cada pocillo de 100 µl de una solución de paranitrofenilfosfato disódico (PnPP) (Sigma) a 1 mg/ml, en un tampón DEA-HCl. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente y protegido de la luz, la absorbancia a 405 nm se mide usando un lector de placas (Multiskan MCC340 Wallace). Los ratones se consideran seroconvertidos cuando la absorbancia obtenida es 2,5 veces mayor que la absorbancia obtenida con el control negativo resultante del suero de ratones sanos y naturales (Figura 10).

40 Todos los ratones vacunados del lote (i) presentan una seroconversión a diferencia de los ratones no vacunados del lote (ii).

b) Perfil isotípico de las IgG anti-*N. caninum*

45 El extracto parasitario total de la cepa NC-1 se diluye en un tampón carbonato a pH 9,6 para obtener una concentración final de 10 µg/ml. Las placas de fondo plano de 96 pocillos se sensibilizan durante la noche a +4 °C depositando en cada pocillo 100 µl de extracto total de *N. caninum*. Las placas se lavan luego tres veces con el tampón de lavado (PBS 1X - Tween 20 al 0,05 %) y luego se saturan durante 1h30 a 37 °C con una solución de PBS 1X - Tween 20 al

- 0,05 % suplementado con suero de albúmina bovina al 4 % (BSA) (Sigma). Luego se retira el medio. Los sueros para el ensayo se diluyen a 1/100 en una solución de PBS 1X - Tween 20 al 0,05 % y se depositan por duplicado en los pocillos. Después de una hora de incubación a 37 °C y una nueva serie de lavado, los anticuerpos secundarios se depositan. Los anticuerpos secundarios anti-IgG 1 (BD 557272, IgG 1 de rata anti-ratón) y anti-IgG2a (BD 553389, IgG2a de rata anti-ratón) acoplados a fosfatasa alcalina y diluidos a 1/1000 se depositan a razón de 100 µl por pocillo. Las muestras se incuban luego durante una hora a 37 °C. Después de una nueva serie de tres lavados, la revelación se realiza mediante la adición a cada pocillo de 100 µl de una solución de paranitrofenilfosfato disódico (PnPP) (Sigma) a 1 mg/ml, en un tampón DEA-HCl. Después de 20 minutos de incubación a temperatura ambiente y protegido de la luz, la absorbancia a 405 nm se mide usando un lector de placas (Multiskan MCC340 Wallace) (Figura 11).
- 10 Las IgG anti-*N. caninum* de los ratones vacunados del lote (i) son preferentemente del tipo IgG2A, perfil isotípico favorable para una protección contra *Neospora caninum* (Long y col., J. Parasitol., 1998, Abr; 84(2):316-20).

Ejemplo 9: Eficacia de la cepa mutante Neo *mic1-3* KO en la prevención de la neosporosis en un modelo de ratón de neosporosis congénita - Experimento 2

- 15 En la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO descrita en el Ejemplo 3 se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Nov; 7 (6) 893-898; y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133 (4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.
- 20 Los ratones OF1 hembra se separaron en 2 lotes distintos: (i) un lote de 11 ratones vacunados por vía intraperitoneal con 5.10⁷ taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO y (ii) un lote de 6 ratones de control no vacunados.
- 25 Dos meses después de la vacunación, los ratones se pusieron con el macho (D0) a razón de tres ratones hembra para un macho. Las ratas preñadas de los lotes (i) y (ii) se diagnostican mediante pesaje y se someten a una estimulación infecciosa por vía intraperitoneal al décimo día de gestación con 2x10⁶ taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*. La cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum* se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Nov; 7 (6) 893-898; y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133 (4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.
- 30 Un día antes del parto, los ratones hembra fueron sacrificados. Las placentas y los fetos se aislaron y el ADN se extrajo. Una PCR anidada se realiza a partir de la región del gen *NC5* de *N. caninum* (Yamaga y col., J.Parasitol, abril de 1996, 82(2): 272-9, Baszler y col., J Clin Microbiol, Dic de 1999, 37 (12): 4059-64). Para la PCR primaria, el par de cebadores NC5 FA (SEQ ID NO: 31) y NC5 RA (SEQ ID NO: 32) se usa y el par de cebadores NC5 FB (SEQ ID NO: 33) y NC5 RB (SEQ ID NO: 34) se usa para la PCR secundaria. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla XI a continuación.
- 35 Tabla XI: Listado de cebadores usados para las PCR de búsqueda de la presencia del parásito *N. caninum* en los tejidos.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	n.º de secuencia	n.º de PCR
NC5 FA	CCCAGTGCGTCCAATCCTGTAAC	SEQ ID NO: 31	Primario
NC5 RA	CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT	SEQ ID NO: 32	Primario
NC5 FB	TAATCTCCCCGTCATCAGT	SEQ ID NO: 33	Secundario
NC5 RB	GGGTGAACCGAGGGAGTTG	SEQ ID NO: 34	Secundario

- Para cada placenta y feto, se realizan tres PCR independientes. Las placentas y los fetos se consideran positivos cuando *Neospora caninum* se detecta para al menos una PCR. Los resultados se presentan en la Tabla XII a continuación.
- 40 Tabla XII: Búsqueda de *Neospora caninum* en los tejidos placentarios y fetales de ratones vacunados con la cepa Neo *ncmic1-3* KO y estimulados con la cepa silvestre NC1 (lote (i)) en comparación con los ratones de control no vacunados y estimulados con la cepa silvestre NC1 (lote (ii)).

Lote (i) Ratones vacunados con $5 \cdot 10^7$ taquizoítos de la cepa Neo <i>ncmic1-3</i> KO y estimulados con $2 \cdot 10^6$ taquizoítos de la cepa silvestre NC1	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en las placentas		
	Número de placentas estudiadas 131	Número de placentas positivas 15	% de placentas positivas 11,4 %
	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en los fetos		
	Número de fetos estudiados 142	Número de fetos positivos 7	% de fetos positivos 4,93 %
Lote (ii) Ratones no vacunados y estimulados con $2 \cdot 10^6$ taquizoítos de la cepa silvestre NC1	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en las placentas		
	Número de placentas estudiadas 88	Número de placentas positivas 82	% de placentas positivas 93,2 %
	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en los fetos		
	Número de fetos estudiados 87	Número de fetos positivos 52	% de fetos positivos 59,8 %

Estos resultados demuestran que la vacunación con la cepa mutante atenuada Neo *ncmic1-3* KO reduce significativamente la transmisión materno-fetal del parásito, validando la efectividad de la cepa Neo *mic1-3* KO para prevenir los efectos nocivos de la neosporosis en un modelo de ratón de neosporosis congénita patógena.

5 Ejemplo 10: Eficacia de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO en la prevención de la neosporosis en un modelo de ratón de neosporosis congénita después de la infección de las madres antes de la gestación

La cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO descrita en el Ejemplo 3 se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS); glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., noviembre de 2000; 7 (6) 893-898 y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133(4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.

Los ratones OF1 hembra se separaron en 3 lotes distintos:

- Lote (i): lote de control formado por 9 ratones infectados por vía intraperitoneal con $5 \cdot 10^6$ taquizoítos de la cepa NC-1,
- Lote (ii): lote formado por 9 ratones infectados por vía intraperitoneal con $5 \cdot 10^6$ taquizoítos de la cepa silvestre NC-1 y luego vacunados 58 días después con $5 \cdot 10^7$ taquizoítos de la cepa Neo *ncmic1-3* KO por vía intraperitoneal,
- Lote (iii): lote formado por 9 ratones vacunados por vía intraperitoneal con $5 \cdot 10^7$ taquizoítos de la cepa Neo *ncmic1-3* KO luego infectados, 58 días después, por vía intraperitoneal con $5 \cdot 10^6$ taquizoítos de la cepa silvestre NC-1.

Ciento siete días después del comienzo del experimento, los ratones se pusieron con el macho a razón de 3 ratones hembra para un macho. Las ratas gestantes se diagnostican mediante peso.

A los 18 días de gestación, un día antes de los nacimientos teóricos, los ratones hembras son sacrificados. Los fetos se aíslan y se extrae el ADN.

Una PCR anidada se realiza a partir de la región del gen NC5 de *N. caninum* (Yamage y col., J. Parasitol, abril de 1996, 82 (2): 272-9, Bazler y col., J. Clin. Microbiol, Dic de 1999, 37 (12): 4059-64). Para la PCR primaria, el par de cebadores NC5 FA (SEQ ID NO: 31) y NC5 RA (SEQ ID NO: 32) se usa y el par de cebadores NC5 FB (SEQ ID NO: 33) y NC5 RB (SEQ ID NO: 34) se usa para la PCR secundaria. Las secuencias de los cebadores se muestran en la Tabla XIII a continuación.

Tabla XIII: Listado de cebadores usados para las PCR de búsqueda de la presencia del parásito *N. caninum* en los tejidos.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	n.º de secuencia	n.º de PCR
NC5 FA	CCCAGTGCCTCAATCCTGTAAC	SEQ ID NO: 31	Primario
NC5 RA	CTCGCCAGTCAACCTACGTCTTCT	SEQ ID NO: 32	Primario
NC5 FB	TAATCTCCCCCGTCATCAGT	SEQ ID NO: 33	Secundario
NC5 RB	GGGTGAACCGAGGGAGTTG	SEQ ID NO: 34	Secundario

30 Para cada feto, se realizan 3 PCR independientes. El feto se considera positivo cuando *Neospora caninum* se detecta para al menos una PCR. Los resultados se muestran en la Tabla XIV a continuación.

Tabla XIV: Búsqueda de *Neospora caninum* en tejidos placentarios y fetales de ratones jóvenes nacidos de madres infectadas antes de la gestación (lote (i)), madres infectadas y luego vacunadas antes de la gestación (Lote (ii)) y madres que fueron vacunadas y luego infectadas antes de la gestación (Lote (iii)).

Lote (i) 9 ratones infectados con $5 \cdot 10^6$ taquizoítos de la cepa silvestre NC1 antes de ponerlos con el macho	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en las placentas		
	Número de placentas estudiadas 96	Número de placentas positivas 28	% de placentas positivas 29,2 %
	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en los fetos		
	Número de fetos estudiados 97	Número de fetos positivos 32	% de fetos positivos 33 %
Lote (ii) 9 ratones infectados con $5 \cdot 10^6$ taquizoítos de la cepa silvestre NC1 luego vacunados con $5 \cdot 10^7$ taquizoítos de la cepa Neo <i>mic1-3</i> KO antes de ponerlos con el macho	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en las placentas		
	Número de placentas estudiadas 110	Número de placentas positivas 13	% de placentas positivas 11,81 %
	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en los fetos		
	Número de fetos estudiados 113	Número de fetos positivos 15	% de fetos positivos 13,27 %
Lote (iii) 9 ratones vacunados con $5 \cdot 10^7$ taquizoítos de la cepa Neo <i>mic1-3</i> KO luego infectados con $5 \cdot 10^6$ taquizoítos de la cepa silvestre NC1 antes de ponerlos con el macho	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en las placentas		
	Número de placentas estudiadas 88	Número de placentas positivas 20	% de placentas positivas 22,72 %
	Búsqueda de <i>Neospora caninum</i> en los fetos		
	Número de fetos estudiados 88	Número de fetos positivos 13	% de fetos positivos 14,7 %

5 Estos resultados demuestran que la vacunación con la cepa mutante atenuada *Neo ncmic1-3 KO* reducía significativamente (Ensayo de Chi2, $p < 0,05$) la transmisión materno-fetal del parásito cuando las madres están infectadas antes de la gestación, validando así la eficacia profiláctica y terapéutica de la cepa *Neo ncmic1-3 KO* para prevenir los efectos nocivos de la neosporosis en un modelo de ratón de neosporosis congénita con infección de la madre antes de la gestación.

10 **Ejemplo 11: Ensayo de diagnóstico para diferenciar la cepa de la vacuna Neo *mic1-3* KO de la cepa silvestre NC1 después de inyección a ratones.**

15 La cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO descrita en el Ejemplo 3 se mantuvo mediante pases regulares en células HFF cultivadas en DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS); glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Los pases en las células HFF reducen la virulencia de los parásitos (Baszler y col., Clin. Diagn. Lab. Immunol., noviembre de 2000; 7 (6) 893-898 y Bartley y col., Parasitology, 2006, Oct; 133(4): 421-32), el número de pases en las células HFF se limita voluntariamente a 20.

Los ratones hembra Balb/c se separaron en 2 lotes distintos:

- un lote inyectado por vía intraperitoneal con $5 \cdot 10^7$ taquizoítos de la cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO,
- y un lote inyectado por vía intraperitoneal con 10^7 taquizoítos de la cepa silvestre NC1 de *Neospora caninum*.

20 Los ratones fueron sacrificados. Luego se extrajo el cerebro de los ratones y se trituró en un medio RPMI usando un Potter. Una parte del producto triturado se deposita en células HFF en medio DMEM suplementado con 10 % de suero de ternera fetal (FCS), glutamina 2 mM, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomina. Luego se recogen los parásitos y se extrae su ADN genómico.

A partir del ADN genómico, se realizaron PCR para:

- 25
- verificar la presencia o ausencia del gen *ncmic3* con el conjunto de cebadores de la PCR n.º 1: ORF NCmic3 F (SEQ ID NO: 7) y ORF NCmic3 R (SEQ ID NO: 8).

- verificar la presencia o ausencia del casete *DHFR* con el conjunto de cebadores de la PCR n.º 2: ORF *DHFR* F (SEQ ID NO: 9) y ORF *DHFR* R (SEQ ID NO: 10).
 - verificar la presencia o ausencia del gen *ncmic1* con el conjunto de cebadores de PCR n.º 3: *Ncmic1* de parada (SEQ ID NO: 39) y ORF *NCmic1* R (SEQ ID NO: 25).
- 5 • verificar la presencia o ausencia del casete *CATGFP* con el conjunto de cebadores de PCR n.º 4: ORF *CATGFP* F3 (SEQ ID NO: 49) y *CATGFP* de parada (SEQ ID NO: 42).

Las secuencias de los cebadores y el tamaño de los amplicones resultantes de las diferentes PCR se muestran respectivamente en las Tablas XVI y XVII a continuación.

10 Tablas XVI: Listados de cebadores usados para diagnosticar ratones vacunados con la cepa Neo *ncmic1-3* KO y ratones infectados con la cepa NC-1 de *N. caninum*.

Nombre del cebador	Secuencia 5' → 3'	n.º de secuencia	n.º de PCR
ORF <i>NCmic3</i> F	TTTCCCTTCTAAACACAGTCG	SEQ ID NO: 7	1
ORF <i>NCmic3</i> R	CCTTCAGTGGTTCTCCATGAG T	SEQ ID NO: 8	1
ORF <i>DHFR</i> F	CCTTCTCAGACAACGGGGTA	SEQ ID NO: 9	2
ORF <i>DHFR</i> R	AGATCTTACGCCCTTCTCA	SEQ ID NO: 10	2
<i>Ncmic1</i> de parada	TTACAATTCAGATTCACCCG	SEQ ID NO: 39	3
ORF <i>NCmic1</i> R	TTCTCCAGGCACTCACCT	SEQ ID NO: 25	3
ORF <i>CATGFP</i> F3	TTCATCATGCCGTTTGTGAT	SEQ ID NO: 49	4
<i>CATGFP</i> de parada	TTAATCGAGCGGGTCCTGGT	SEQ ID NO: 42	4

Tablas XVII: Tamaño de los amplicones obtenidos en pares de bases de las diferentes PCR que permiten el diagnóstico diferencial entre ratones vacunados con la cepa Neo *ncmic1-3* KO y ratones infectados con la cepa NC-1 de

n.º de PCR	<i>N. caninum</i> . Neo <i>ncmic1-3</i> KO	<i>Neospora caninum</i> (NC-1)
1	-	850
2	504	-
3	-	716
4	875	-

15 Los amplicones obtenidos por PCR a partir de las muestras de ratones vacunados y los obtenidos a partir de las muestras de ratones expuestos a la cepa NC-1 (figura 14) se ajustan a los perfiles esperados y destacan:

- la ausencia de genes *ncmic3* y *ncmic1* y la presencia de casetes *DHFR* y *CATGFP* para muestras de ratones vacunados con cepa mutante Neo *ncmic1-3* KO
- la presencia de genes *ncmic3* y *ncmic1* y la ausencia de casetes *DHFR* y *CATGFP* para muestras de ratones infectados con la cepa NC-1 de *N. caninum*.

20 Estos resultados confirman la posibilidad de diferenciar los animales vacunados de los animales infectados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> VitamFero

<120> CEPAS MUTANTES DE NEOSPORA Y SUS USOS

<130> WOB 11 CA ITA NEKO <160> 49

25 <170> PatentIn versión 3.5

ES 2 755 952 T3

	<210> 1	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> 5 HR NCmic3 F KpnI	
	<400> 1	
	cgcggtaccc atgtgaatat gctttaaccg tgac	34
10	<210> 2	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> 5 HR NCmic3 R ClaI	
15	<400> 2	
	cgcatcgatg agctataacc ctggaaatg actc	34
20	<210> 3	
	<211> 31	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> 3 HR NCmic3 F XbaI	
	<400> 3	
	cgctctagac atgctgatga agaaggaag t	31
25	<210> 4	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> 3 HR NCmic3 R NotI	
	<400> 4	
	cgcgcgccg ctctctctg aagtcttga gacc	34
35	<210> 5	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HR NCmic3 F	
40	<400> 5	
	gtcatcgacc gccggaacta gtagt	25
45	<210> 6	
	<211> 26	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> HR NCmic3 R	
	<400> 6	
	gcagaggttc tgcgtatcta acacgg	26
50	<210> 7	
	<211> 21	
	<212> DNA	

ES 2 755 952 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ORF NCmic3 F	
5	<400> 7 ttcccttct aaacacagtc g	21
	<210> 8	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> ORF NCmic3 R	
	<400> 8 ccttcagtgg ttctcatga gt	22
	<210> 9	
15	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ORF DHFR F	
20	<400> 9 ccttctcaga caacgggga	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ORF DHFR R	
	<400> 10 agatcttcac gcccttctca	20
30	<210> 11	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> Integ NCmic3 F	
	<400> 11 gaaagtgca gtgtagaga ctgc	24
	<210> 12	
	<211> 27	
40	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ORF NCmic3 R2	
45	<400> 12 ccttcactcg agatcgcgca aatgagc	27
	<210> 13	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

ES 2 755 952 T3

	<223> ORF DHFR R2	
	<400> 13 ggacctctgt acgagacatg ccg	23
5	<210> 14 <211> 24 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Integ NCmic3 R	
10	<400> 14 tgtttacagg tgatccagaa aagg	24
	<210> 15 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
15	<220> <223> ORF NCmic3 F2	
	<400> 15 gaatttggg acaggggaat	20
20	<210> 16 <211> 25 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> ORF DHFR F2	
25	<400> 16 gtctctcgtt ttctctctt ttcgg	25
	<210> 17 <211> 33 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220> <223> 3 HR NCmic1 F KpnI	
	<400> 17 cgcggtacca ggcagaagta aagaaggctc ctc 33 <210> 18 <211> 30 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> 3 HR NCmic1 R HindIII	
	<400> 18 cgcaagcttt gatcagcaa gaaaagaagc	30
40	<210> 19 <211> 32 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> 5 HR NCmic1 F BamHI	
45	<400> 19 cgcgatccc attgtagat acggtgcac ac	32
50		

ES 2 755 952 T3

<210> 20
 <211> 33
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> 5 HR NCmic1 R NotI
 <400> 20
 cgcgcgggccg cacattcaga cggcagaact ctg 33
 10 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Integ NCmic1 F
 15 <400> 21
 ccgagcaagt tagcaagtcc 20
 <210> 22
 <211> 20
 <212> DNA
 20 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> ORF CATGFP R
 <400> 22
 ccgtttggtg gatgtctct 20
 25 <210> 23
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 30 <223> ORF CATGFP F
 <400> 23
 gcatcgactt caaggaggac 20
 <210> 24
 <211> 20
 <212> DNA
 35 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Integ NCmic1 R
 <400> 24
 40 ctgtccgctc acatcgttg 20
 <210> 25
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Secuencia artificial
 45 <220>
 <223> ORF NCmic1 R
 <400> 25
 ttctccaggc actcacctct 20
 <210> 26
 <211> 20
 <212> DNA
 50

ES 2 755 952 T3

	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ORF NCmic1 F	
5	<400> 26 agctccaac aacgagagga	20
	<210> 27	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> ORF NCmic1 F2	
	<400> 27 cccaggatat cgttgtg	20
	<210> 28	
15	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ORF NCmic1 R2	
20	<400> 28 cttctgatgc acggaactga	20
	<210> 29	
	<211> 20	
	<212> DNA	
25	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ORF CATGFP F2	
	<400> 29 cctgaagtc atctgcacca	20
30	<210> 30	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> ORFCATGFP R2	
	<400> 30 gtagtggtg tcgggcagca	20
	<210> 31	
40	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> NC5 FA	
45	<400> 31 cccagtcgt ccaatcctgt aac	23
	<210> 32	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
50	<220>	

ES 2 755 952 T3

	<223> NC5 RA	
	<400> 32	
	ctgccagtc aacctacgtc ttct	24
5	<210> 33 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> NC5 FB	
10	<400> 33	
	taatctcccc cgatcatcagt	20
	<210> 34 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
15	<220>	
	<223> NC5 RB	
	<400> 34	
	gggtgaaccg agggagtgtg	19
20	<210> 35 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> ATG Ncmic1	
	<400> 35	
	atgggccagt cggtggtttt	20
	<210> 36 <211> 20 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> ATG Ncmic3	
	<400> 36	
35	atgcgtggcg gggcgtccgc	20
	<210> 37 <211> 19 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> ATG DHFR	
	<400> 37	
	atgcagaaac cggtgtgtc	19
45	<210> 38 <211> 22 <212> DNA <213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ATG CATGFP	
50	<400> 38	

ES 2 755 952 T3

	atgcatgaga aaaaaatcac tg	22
	<210> 39	
	<211> 20	
5	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Ncmic1 de parada	
	<400> 39	
	ttacaattca gattcaccgg	20
10	<210> 40	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
15	<223> Ncmic3 de parada	
	<400> 40	
	ttatcgagcc gttccgatt tg	22
	<210> 41	
20	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> DHFR de parada	
	<400> 41	
25	ctagacagcc atctcatct g	21
	<210> 42	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> CATGFP de parada	
	<400> 42	
	ttaatcgagc gggctctggt	20
35	<210> 43	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Olig 1	
40	<400> 43	
	cagatggaga tggctgtcta g	21
	<210> 44	
	<211> 20	
45	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Olig 2	
	<400> 44	
	cgctttcggt ctgattgaca	20
50	<210> 45	

ES 2 755 952 T3

	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
5	<220>	
	<223> Olig 3	
	<400> 45	
	aaaaccaccg actggccat	20
10	<210> 46	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Olig 4	
15	<400> 46	
	tcctctcgtt gttggaagct	20
20	<210> 47	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Olig 5	
	<400> 47	
	tagcacggga aaggattgac	20
25	<210> 48	
	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Olig 6	
30	<400> 48	
	caagatccgc cacaacatc	19
35	<210> 49	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> ORF CATGFP F3	
40	<400> 49	
	tcatcatgc cgtttgat	20

REIVINDICACIONES

1. Cepa mutante de *Neospora caninum* en la que la función de la proteína NcMIC3 se suprime mediante la delección de todo el gen *ncmic3*.
- 5 2. Cepa mutante de *Neospora caninum* según la reivindicación 1, en la que el gen de selección *dhfr* que codifica la proteína DHFR se inserta por recombinación homóloga en lugar del gen *ncmic3*.
3. Cepa mutante de *Neospora caninum* según la reivindicación 1, en la que la función de la proteína NcMIC1 se suprime mediante la delección de todo el gen *ncmic1*.
- 10 4. Cepa mutante de *Neospora caninum* según la reivindicación 3, en la que el gen de selección *dhfr* que codifica la proteína DHFR se inserta por recombinación homóloga en lugar del gen *ncmic3* y/o el gen de selección *cat-gfp* que codifica la proteína CAT-GFP se inserta por recombinación homóloga en lugar del gen *ncmic1*.
5. Composición farmacéutica que comprende una cepa mutante de *Neospora caninum* en la que la función de la proteína NcMIC3 se suprime según la reivindicación 1 o 2 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 6. Composición farmacéutica que comprende una cepa mutante de *Neospora caninum* en la que la función de la proteína NcMIC3 y la función de la proteína NcMIC1 se suprimen según la reivindicación 3 o 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Composición de vacuna que comprende una cepa mutante como se define según la reivindicación 1 o 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de neosporosis en animales de compañía, como perros y caballos y animales de producción, como ovinos, caprinos, bovinos, porcinos, camélidos y cérvidos.
- 20 8. Composición de vacuna que comprende una cepa mutante como se define según la reivindicación 2 o 4 y un vehículo farmacéuticamente aceptable para su uso en el tratamiento de neosporosis en animales de compañía, como perros y caballos y animales de producción, como ovinos, caprinos, bovinos, porcinos, camélidos y cérvidos.
9. Composición de vacuna para uso según la reivindicación 7, para administración en una dosis unitaria variable de 10^2 a 10^9 taquizoítos de una cepa mutante como se define según la reivindicación 1 o 3.
- 25 10. Composición de vacuna para uso según la reivindicación 8, para administración en una dosis unitaria variable de 10^2 a 10^9 taquizoítos de una cepa mutante como se define según la reivindicación 2 o 4.
11. Procedimiento *in vitro* de diagnóstico diferencial para discriminar si un mamífero es un mamífero vacunado con una composición como se define según la reivindicación 8 o 10, o un mamífero que no vacunado, comprendiendo dicho procedimiento las siguientes etapas:
 - 30 i) determinación de la presencia de anticuerpos anti-DHFR y/o anti-CAT-GFP, y/o, determinación de la presencia de antígenos DHFR y/o CAT-GFP,
o
 - ii) determinación del nivel de expresión de los genes *dhfr* y/o *cat-gfp*, y/o, determinación de la presencia de los genes *dhfr* y/o *cat-gfp*,
- 35 en una muestra biológica del mamífero mencionado anteriormente, determinación de la presencia de anticuerpos anti-DHFR y/o anti-CAT-GFP, y/o determinación de la presencia de antígenos DHFR y/o CAT-GFP, o determinación del nivel de expresión de los genes *dhfr* y/o *cat-gfp*, y/o determinación de la presencia de los genes *dhfr* y/o *cat-gfp*, significando que dicho mamífero es un mamífero vacunado.

FIGURA 1

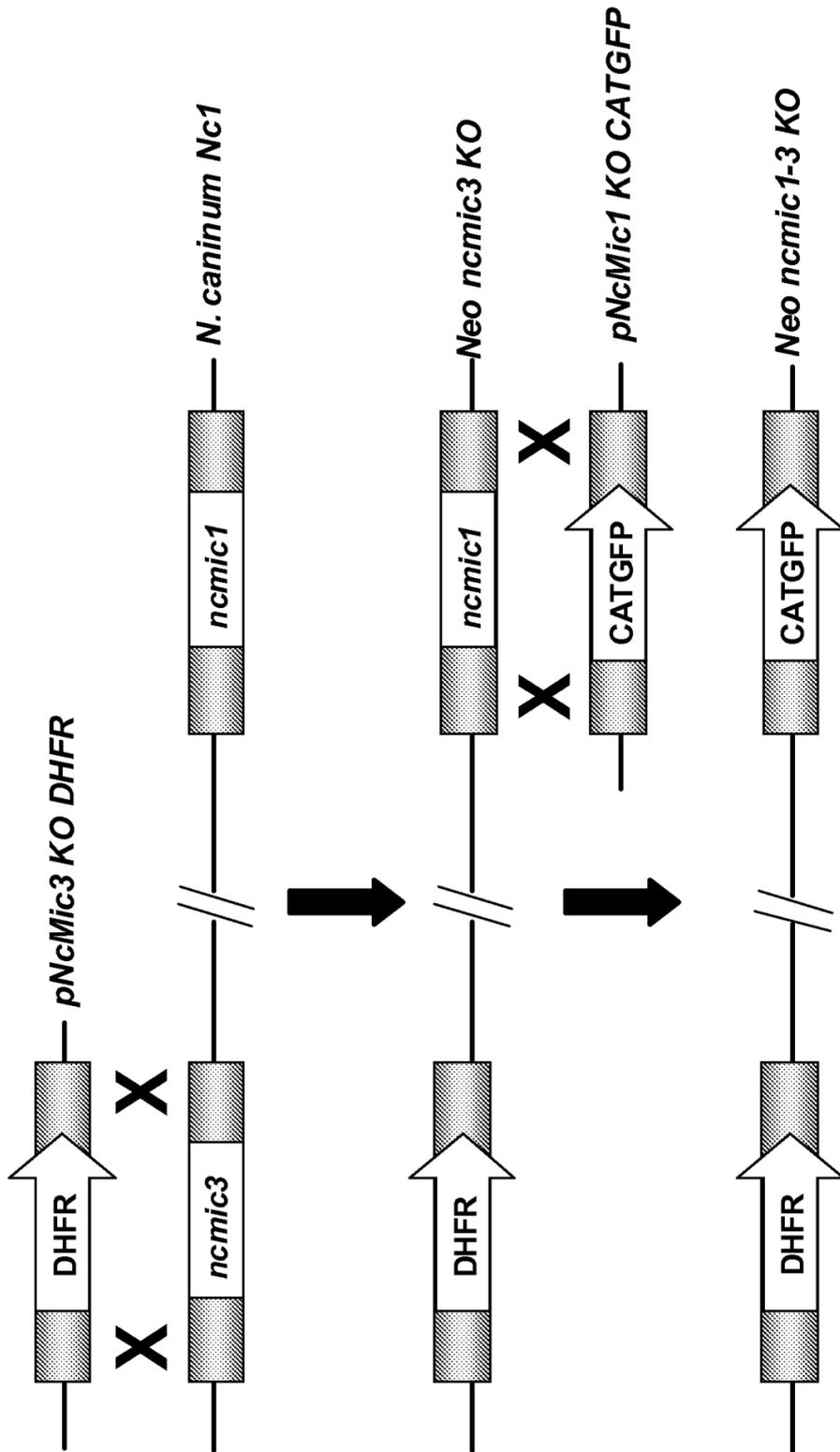


FIGURA 2-A

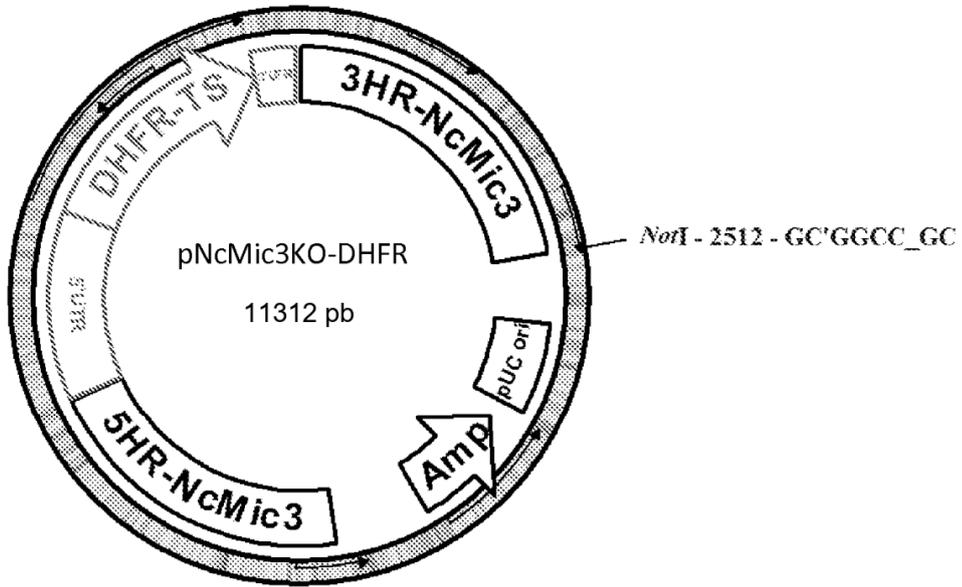


FIGURA 2-B

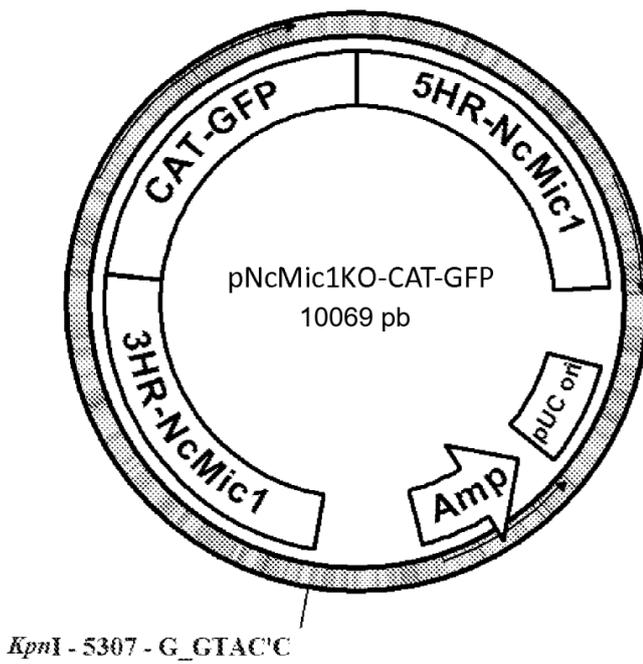


FIGURA 3-A

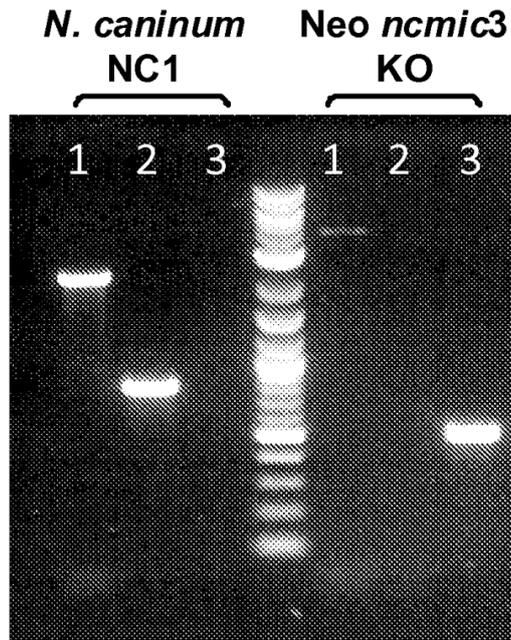


FIGURA 3-B

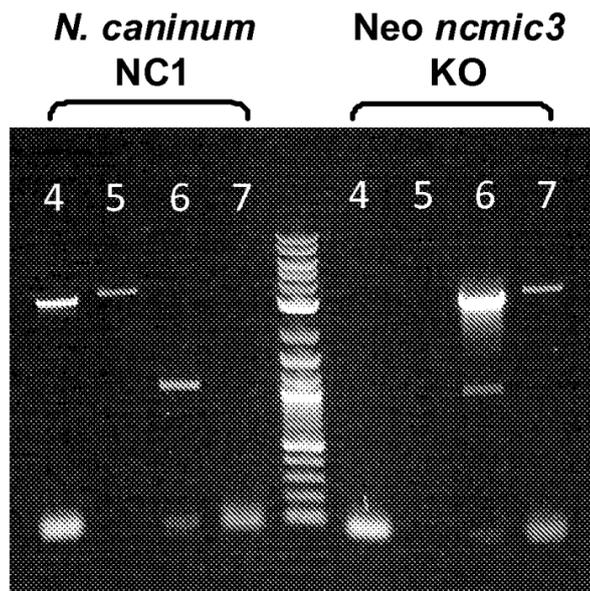


FIGURA 4-A

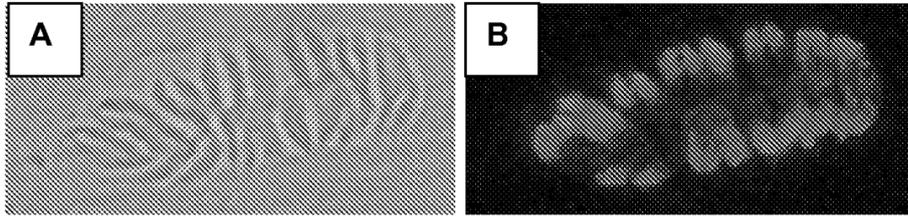


FIGURA 4-B

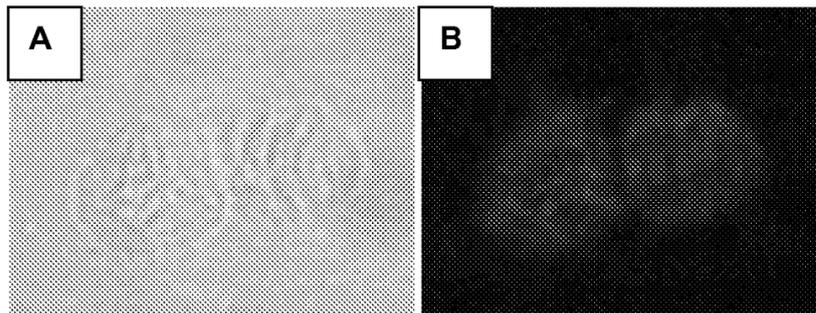


FIGURA 5

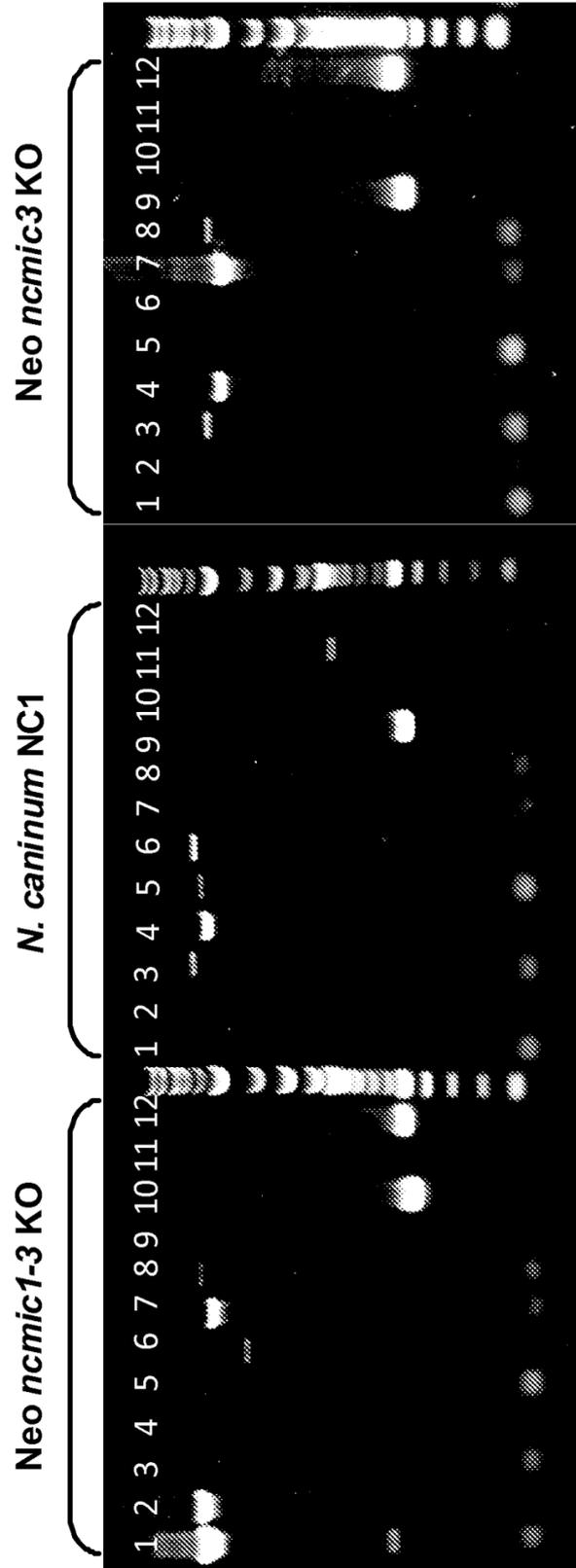


FIGURA 6

Neo *ncmic3* KO Neo *ncmic1-3* KO

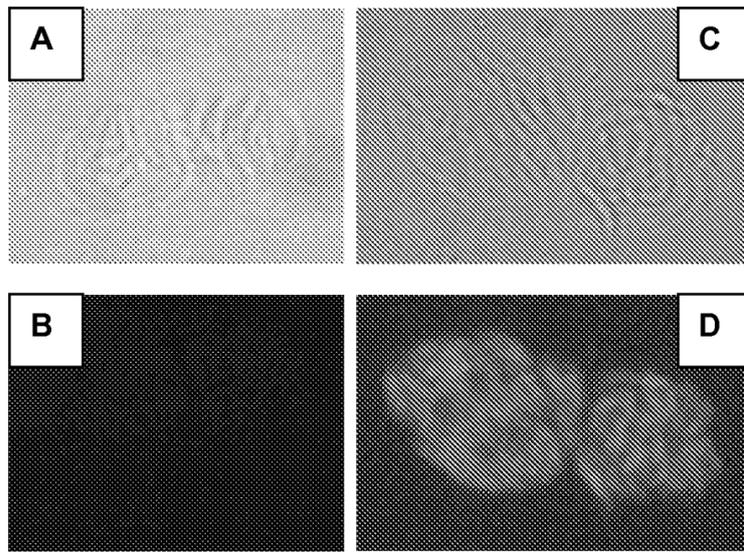


FIGURA 7

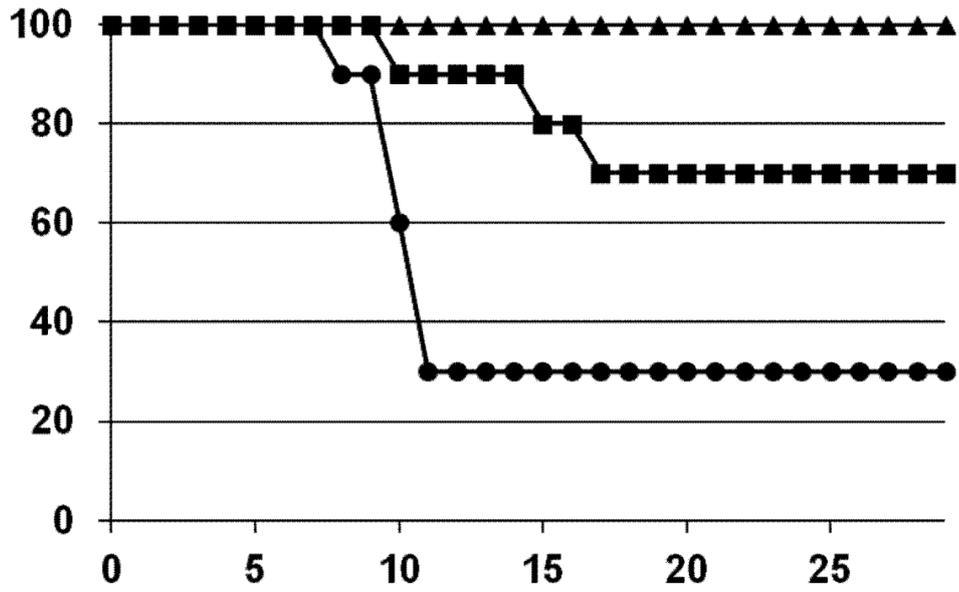


FIGURA 8

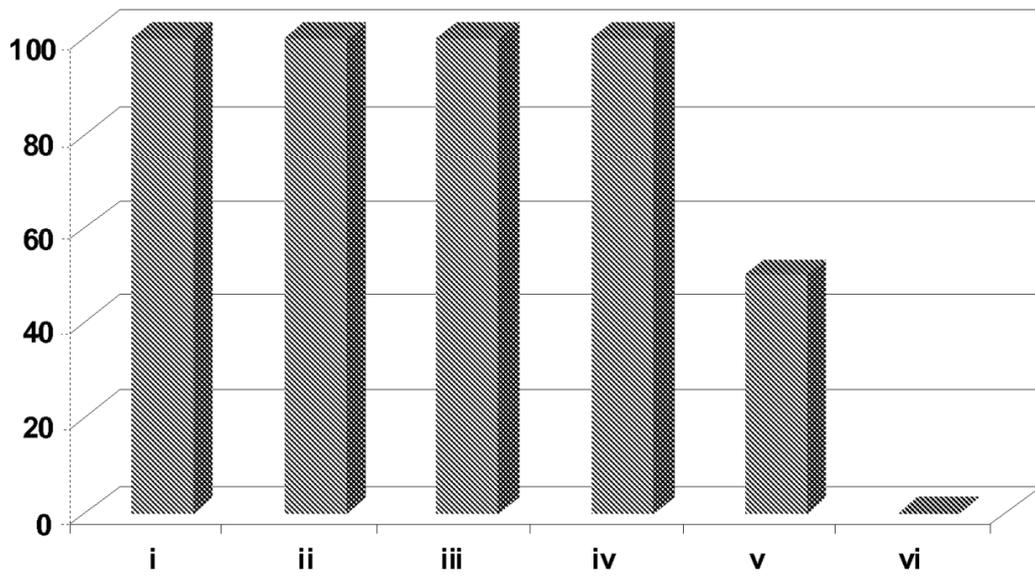


FIGURA 9

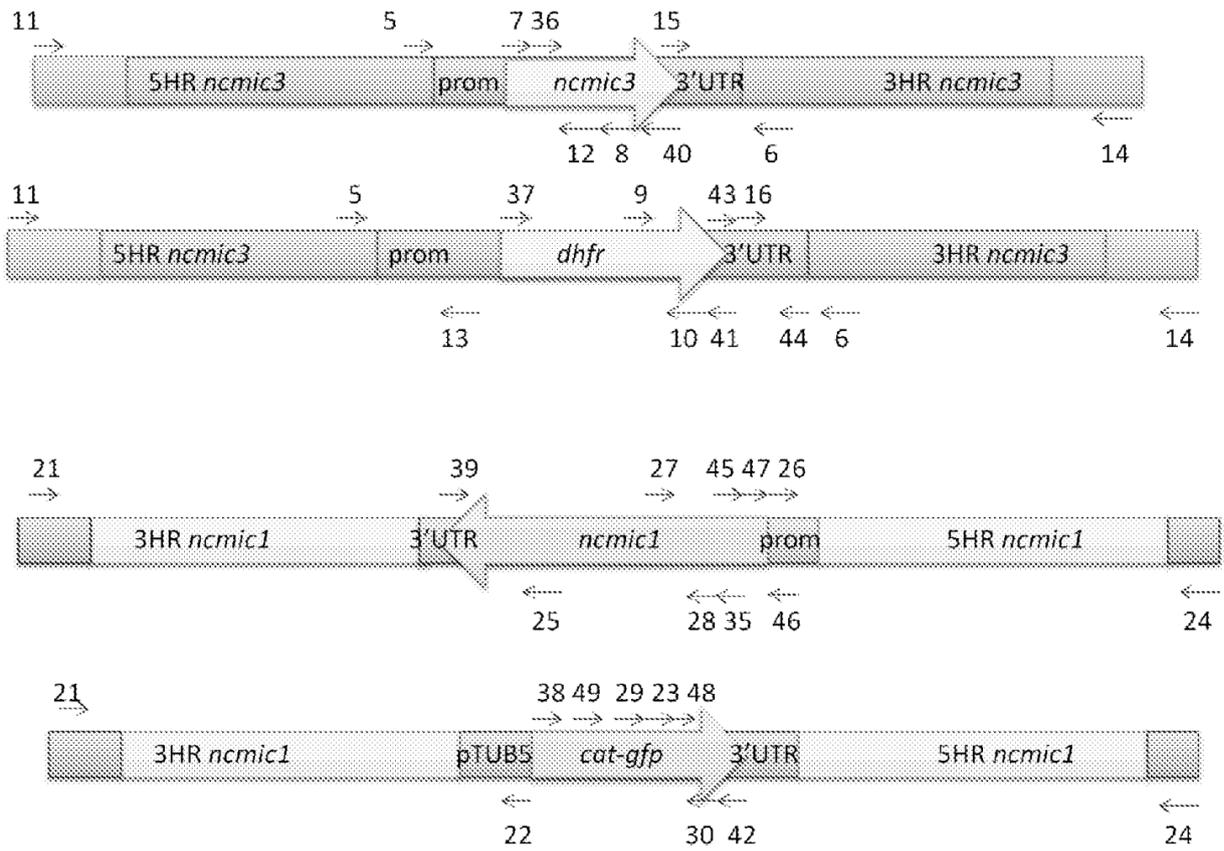


FIGURA 10

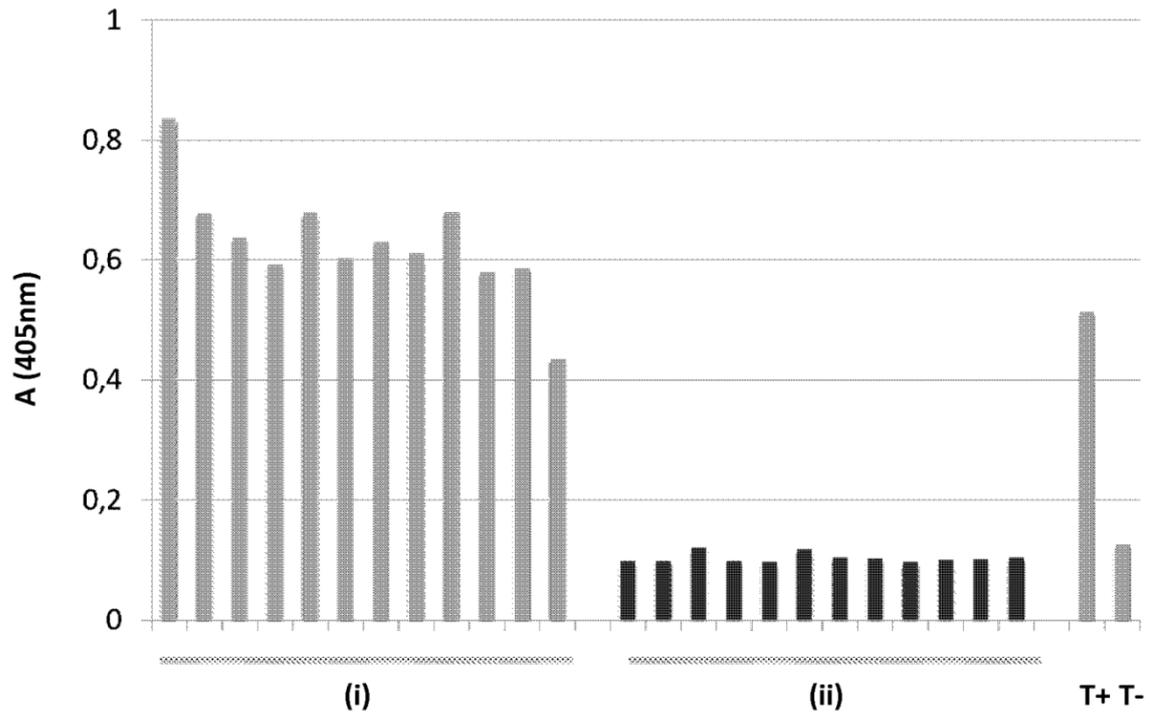


FIGURA 11

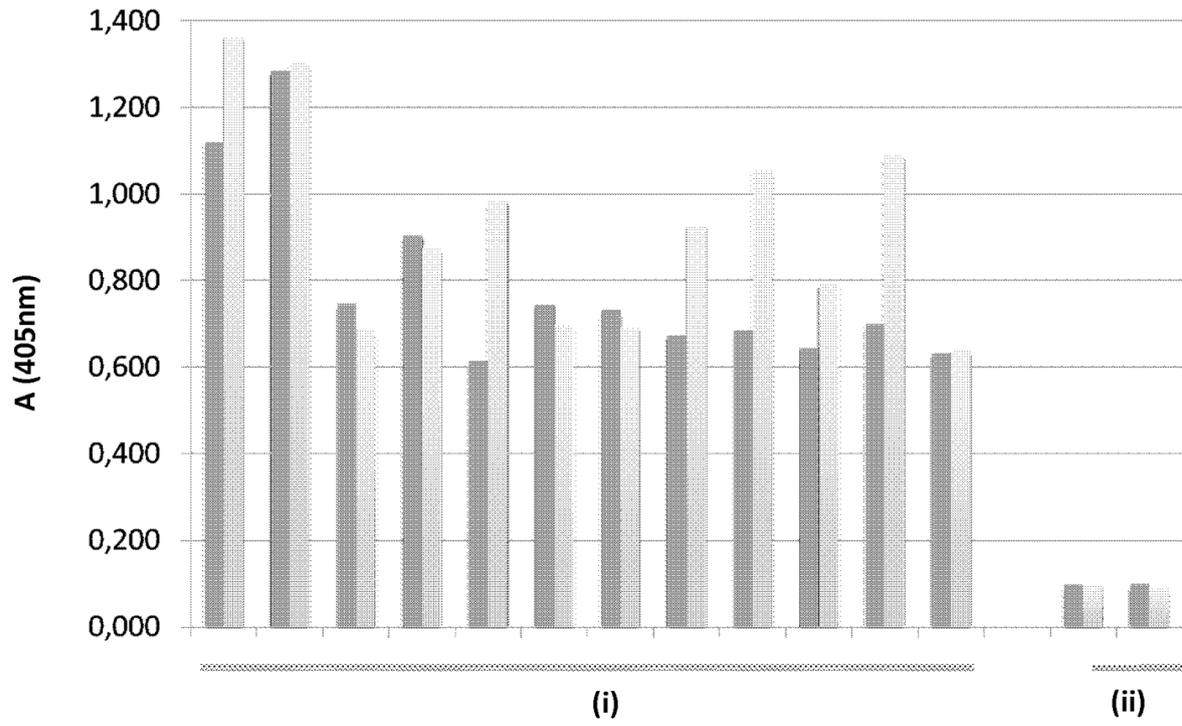


FIGURA 12-A

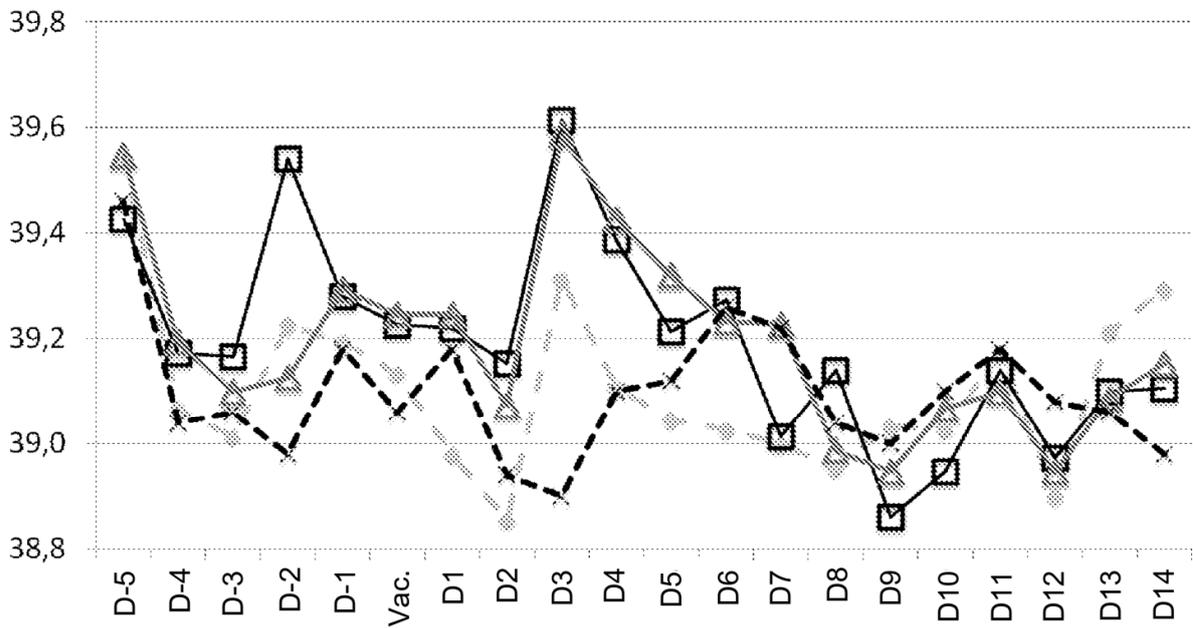


FIGURA 12-B

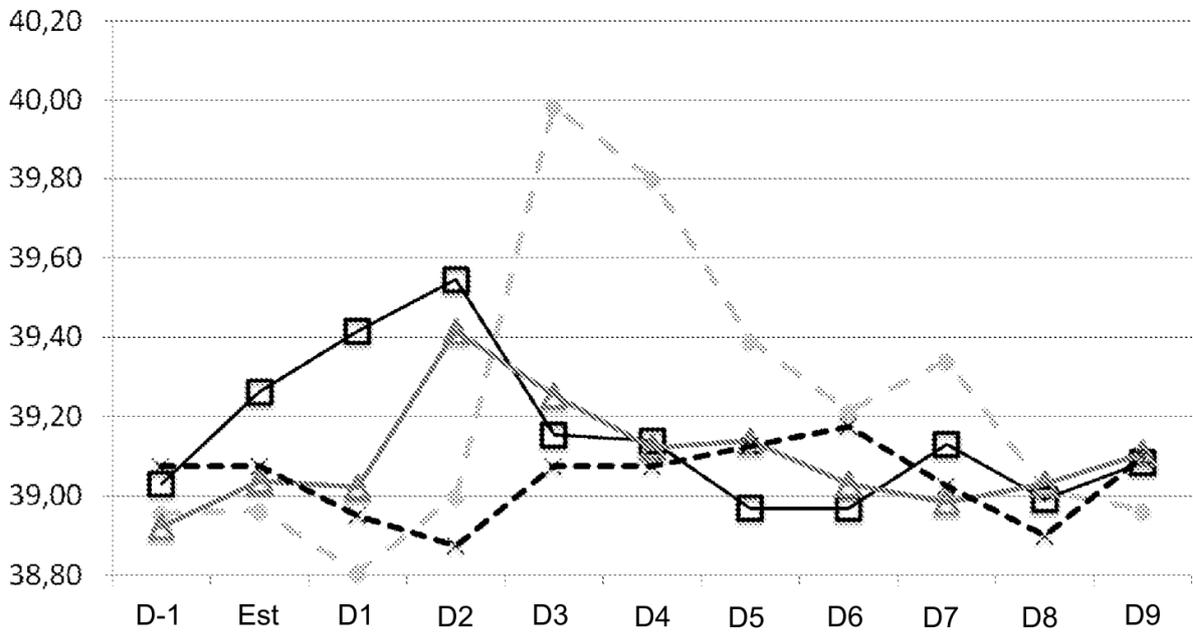


FIGURA 13

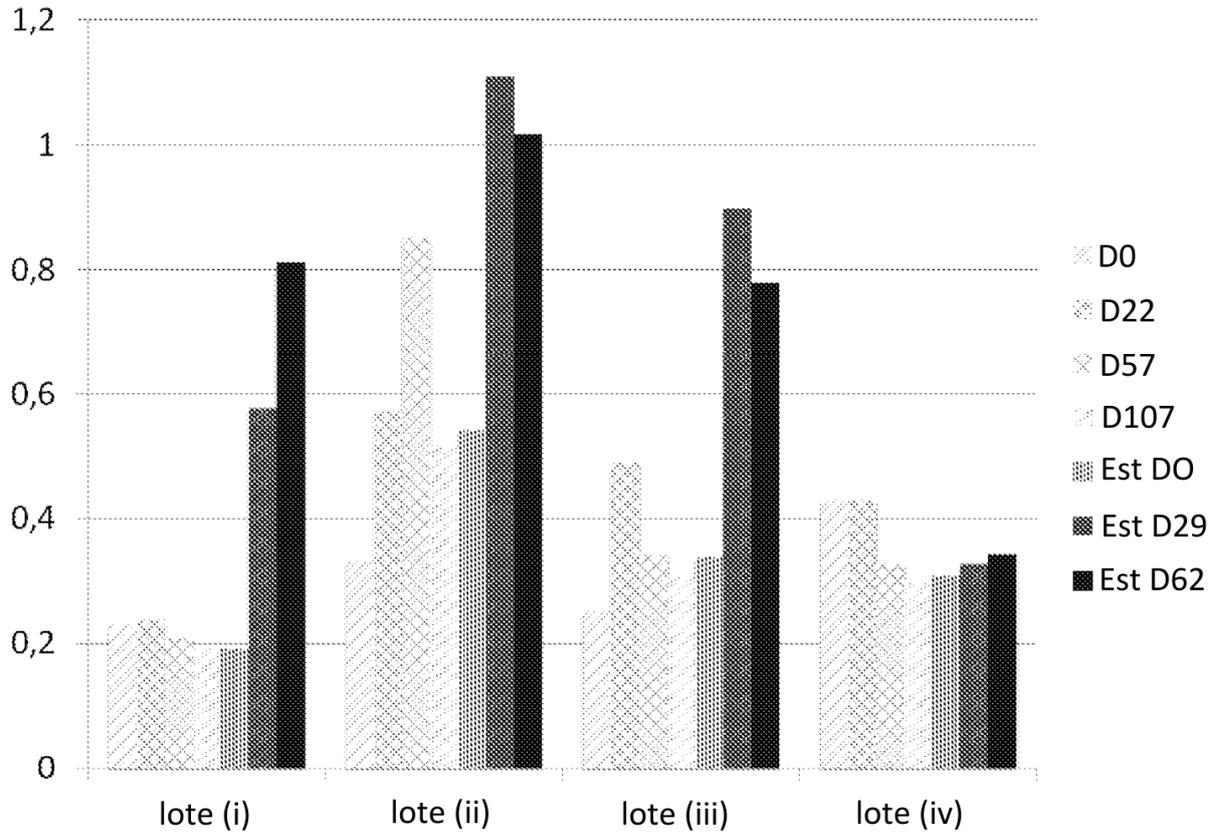


FIGURA 14

