



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 266 167**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **01911285 .3**

86 Fecha de presentación : **15.03.2001**

87 Número de publicación de la solicitud: **1183393**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **06.03.2002**

54 Título: **Identificación basada en PCR de especies de cepas de *Eimeria*.**

30 Prioridad: **15.03.2000 AU PQ6229/00**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.03.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.03.2007

73 Titular/es: **Eimeria Pty. Ltd.**
36 Charter Street, Ringwood
Melbourne VIC 3134, AU

72 Inventor/es: **Gasser, Robin, Beat;**
Woods, Wayne, Geoffery;
Richards, David, Grant y
Whithear, Kevin, George

74 Agente: **Pons Ariño, Ángel**

ES 2 266 167 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

Identificación basada en PCR de especies de cepas de *Eimeria*.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a un procedimiento basado en PCR para la identificación de diversas especies del género *Eimeria* (conocida comúnmente como *coccidia*). Más particularmente, la presente invención se refiere a un procedimiento basado en la PCR que es específico del género, utiliza nuevos iniciadores de la PCR y tiene la posibilidad de identificar especies de *Eimeria* que podrían diferir sólo por una variación relativamente menor de la secuencia.

Antecedentes de la invención

Al término de la memoria se recogen los detalles bibliográficos de las publicaciones a que aquí se hace referencia.

Las abreviaturas utilizadas más comúnmente en este texto son: ITS, separador interno transcrito; ITS-1, primer separador interno transcrito; ITS-2, segundo separador interno transcrito; rDNA, DNA ribosómico; TBE, tris-borato EDTA; DPGE, electroforesis por gel de poliacrilamida desnaturalizado; SSCP, polimorfismo de conformación en una sola cadena.

La coccidiosis es una enfermedad de animales y aves causada por parásitos protozoarios (*Eimeria*) conocidos como coccidia. Esta enfermedad es de gran importancia económica para la industria de las aves en todo el mundo.

Las especies de *Eimeria* tienen ciclos vitales complicados, cuyos detalles han sido ya perfectamente descritos. Resumiendo, cuando se ingiere un oocisto coccidial esporulado (infeccioso), se liberan esporozoitos liberándose los ciclos asexuales y sexuales que llevan a la producción de millares de nuevos oocistos, que se introducen en las heces del huésped. Estos oocistos se esporulan en el entorno en el plazo de pocos días y a continuación son infecciosos para aves intactas. Un solo oocisto esporulado puede dar origen a una progenie de varios millares. Las especies de *Eimeria* producen lesiones en el intestino por destrucción de las células epiteliales en las que se desarrollan y multiplican, provocando lesiones en la pared intestinal.

Los signos clínicos de la coccidiosis incluyen diarrea, que puede ser mucoide o sanguinolenta, y deshidratación. Estos síntomas van generalmente seguidos por erizado de las plumas, anemia, decaimiento, pérdida de peso, retracción de la cabeza y cuello y somnolencia. En las gallinas ponedoras, la coccidiosis se detecta habitualmente por la disminución de la producción de huevos. Las aves infectadas dejan de crecer satisfactoriamente. Cuando se trata de cepas altamente virulentas de *Eimeria*, la mortalidad en los pollos suele ser muy elevada.

En la actualidad, se han reconocido siete especies de *Eimeria* como capaces de infectar a los pollos. Estas especies difieren notablemente en su biología y patogenicidad (*McDougald et al*, 1998). El hecho de poder identificar con exactitud las especies de *Eimeria* y sus "cepas" tiene implicaciones importantes para la diagnosis y el control así como para estudiar su epidemiología y la biología de la población.

Las especies de *Eimeria* se han identificado tradicionalmente por una serie de procedimientos. Por ejemplo, las características morfológicas y/o la morfometría de los onsporocistos de sus oocistos (tamaño, forma, longitud y anchura), su tipo de desarrollo, la naturaleza de las lesiones que producen, su predilección como lugar de infestación por el intestino, o los tiempos de esporulación y el índice reproductivo. No obstante, estos criterios pueden ser poco fiables (*Eckert et al*, 1995). Estas limitaciones podrían ser superadas por procedimientos bioquímicos, inmunológicos y moleculares (*Andrews y Chilton*, 1999; *Gasser*, 1997), pero éstos podrían tener, por su parte, otras limitaciones.

Los procedimientos de la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR), que utilizan marcadores genéticos adecuados, podrían utilizarse como alternativas para identificar las especies de *Eimeria*, gracias a su capacidad para amplificar específicamente cantidades diminutas de material parasitario (por ejemplo, *Stucki et al*, 1993). No obstante, los procedimientos descritos hasta la fecha son propios de cada especie, y podrían exigir la realización de una serie de diferentes reacciones de la PCR (usando pares distintos de iniciadores de oligonucleótidos propios de cada especie) a fin de identificar correctamente una especie concreta de *Eimeria*.

Para la identificación y clasificación molecular de organismos, se requiere el análisis de regiones genómicas específicas críticas. Una de estas regiones de los eucariotas se encuentra dentro del DNA ribosómico (rDNA) del genoma nuclear. El rDNA de los eucariotas es una familia multigén formada por unidades que se repiten en pares. Cada unidad comprende un separador exterior transcrito (ETS), los genes que codifican los RNAs (ARNs) 18S y 28S, separados por zonas de separadores internos transcritos (ITS-1 e ITS-2, respectivamente), y un separador intergénico (IGS). Dentro de esta región, las secuencias de ITS-1 e ITS-2 proporcionan unos marcadores genéticos fiables para la identificación de organismos a nivel de las especies, dado que la variación intraespecífica en estas secuencias suele ser baja comparada con los niveles más elevados de diferencia interespecífica.

Se ha demostrado que la ITS-1 y la ITS-2 son marcadores genéticos útiles para la identificación de especies de *Eimeria* (*Tsuji et al*, 1997; *Molloy et al*, 1998; *Schnitzler et al*, 1999), o la detección de variaciones de la población (*Barta et al*, 1998).

Se ha desarrollado un ensayo basado en la PCR que utiliza iniciadores específicos de cada especie en la ITS-1 para tipificar muestras de especies basándose en la detección de un producto de tamaño determinado sobre geles de agarosa (Schnitzler *et al*, 1999). No obstante, este ensayo no permite que se analice la variación de la secuencia dentro de un producto de PCR específico, y podría tener además el inconveniente de que es propio de cada especie.

Por otra parte, Barta *et al*, 1998 han utilizado un enfoque de clonificación/secuenciación para el análisis de la variación de secuencias tanto en las secuencias ITS-1 como ITS-2 dentro de la *E. maxima*. No obstante, este enfoque podría tener limitaciones, especialmente cuando se requieren grandes números de muestras, dado que exige una notable cantidad de trabajo, un tiempo muy prolongado y su coste es elevado. Además, no resuelve necesariamente con exactitud la variación de secuencias entre las diferentes copias de rDNA, es propio de cada especie y podría introducir artefactos en los datos de la secuencia (Gasser, 1997). BARTA, J.R. (“Investigación de las relaciones filogenéticas dentro de los complejos *Apicomplexa* utilizando datos de las secuencias: La búsqueda de la homología”, 1997, Procedimientos: Acompañamiento de los Procedimientos en *Enzymology* 13, 81-88) describe el uso de iniciadores “universales” de la reacción de la cadena de polimerasa que son complementarios para las regiones altamente conservadas de los genes del rRNA 18S, 5.8S y 28S, para amplificación de la PCR de los genes 18S y 5.8S así como las regiones mucho más variables de las ITS-1 e ITS-2. Se utilizaron los datos de secuencia de las secuencias de los genes del rRNA para analizar las reacciones filogenéticas dentro de los *Apicomplexa*. Se comprobó que las regiones ITS-1 e ITS-2 contenían una variación de secuencia primaria suficiente para ser útil en la determinación de las variaciones propias de cinco cepas de *Eimeria maxima*.

La publicación EP-A-0516381 se refiere a un procedimiento para identificar especies individuales de *Eimeria*, por amplificación de la PCR del DNA genómico y la hibridización subsiguiente de los productos de la PCR con sondas genéticas del rRNA de subunidades pequeñas (ssrRNA) propio de cada especie de *Eimeria*. Preferentemente se utilizan iniciadores de la PCR que hacen posible amplificar selectivamente cada una de las unidades de genes del ssrRNA o sus fragmentos. Se exponen igualmente las secuencias de nucleótidos de los genes ssrRNA de las diversas especies de *Eimeria*.

Según TURENNE, C.Y., *et al* (“Identificación rápida de hongos con el uso de la región genética ITS2 y un sistema automatizado de electroforesis capilar fluorescente”, 1999, *J. Clin. Microbiol.* 37, 1846-1851), la región ITS-2 de diversas levaduras de *Candida* no revelaron variabilidad intra-específica entre especies de las que se ensayó más de una cepa. En consecuencia, la variabilidad de la secuencia inter-específica de la región ITS-2 podría utilizarse para el diagnóstico propio de cada especie de aislados fúngicos clínicos. La PCR con iniciadores específicos del hongo dirigido hacia secuencias conservadas de los genes rRNA 5.8S y 28S dan lugar a la amplificación de las regiones ITS-2 propias de cada especie, que son variables en cuanto a la longitud y ampliación. TSUJI, N *et al* (“Discriminación de ocho especies de *Eimeria* de pollo usando la reacción de la cadena de polimerasa en dos pasos”; 1997, *The Journal of Parasitology*, 83, 966-970) describe un procedimiento para la discriminación de ocho especies de *Eimeria*. En una primera etapa, el gen del ssrRNA se amplifica utilizando secuencias conservadas para los genes ssrRNA de los *Apicomplexa* como iniciadores. En la segunda etapa, los productos de la PCR se someten a una segunda PCR que es una PCR-RAPD (amplificación aleatoria del DNA polimórfico), usando iniciadores arbitrarios. El análisis de gel de los productos PCR-RAPD produce unos dibujos en bandas que pueden utilizarse para identificar cada especie individual de *Eimeria*.

Debido al impacto económico de la coccidiosis en la industria avícola, por ejemplo, es importante que las distintas especies de *Eimeria* sean fácilmente identificables, de manera que pueda procederse a un diagnóstico rápido de la enfermedad y a su tratamiento. Además, es conveniente una identificación positiva y fiable de las *Eimeria* para el estudio de la epidemiología de las enfermedades y para controlar la pureza de las líneas de laboratorio de *Eimeria*. En consecuencia, existe la necesidad de desarrollar un ensayo para la rápida identificación de especies de *Eimeria* que no tenga las limitaciones de los ensayos anteriormente descritos.

Más específicamente, el problema que debe resolver la presente invención era el de proporcionar iniciadores adecuados para la amplificación por la PCR de regiones específicas del rDNA de la *Eimeria* de manera específica para cada género, y proporcionar procedimientos de detección y diferenciación de las especies de *Eimeria* basados en la amplificación de la PCR de las citadas regiones del rDNA. Este problema lo resuelve la presente invención como se indica a continuación.

En un aspecto de la presente invención, en ella se proporciona un oligonucleótido que comprende al menos 15 bases consecutivas de la secuencia de DNA, designada SEQ ID N°: 25, o un recocado equivalente de la misma, en la que dicho oligonucleótido es capaz de hibridización específica en condiciones de PCR a una secuencia-blanco, complementaria de al menos las 15 bases consecutivas citadas, y dicho oligonucleótido está adaptado para iniciar la extensión del DNA durante la PCR.

El oligonucleótido comprende preferentemente la secuencia designada SEQ ID N°: 25. Como variante, el oligonucleótido se elige del grupo formado por SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 13; y SEQ ID N°: 15.

En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona un oligonucleótido que comprende al menos 15 bases consecutivas de la secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 26, o un recocado equivalente de la misma, en la que dicho oligonucleótido es capaz de hibridización específica en condiciones de PCR a una secuencia-blanco complementaria al menos a dichas 15 bases consecutivas, y el citado oligonucleótido es adaptado para iniciar la extensión del DNA durante PCR.

ES 2 266 167 T3

El oligonucleótido comprende preferentemente la secuencia designada SEQ ID N°: 26. Como alternativa, el oligonucleótido se elige en el grupo formado por SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 14; y SEQ ID N°: 16.

5 En un segundo aspecto de la presente invención, se proporciona en ella un oligonucleótido que comprende al menos 15 bases consecutivas de la DNA designada SEQ ID N°: 27, o un recocido equivalente de la misma, en la que dicho oligonucleótido es capaz de hibridización específica en condiciones de PCR a una secuencia-blanco complementaria al menos a dichas 15 bases consecutivas, y el citado oligonucleótido es adaptado para iniciar la extensión del DNA durante PCR.

10 El oligonucleótido comprende preferentemente la secuencia designada SEQ ID N°: 27. Como alternativa, el oligonucleótido se elige en el grupo formado por SEQ ID N°: 17; SEQ ID N°: 19; SEQ ID N°: 21; y SEQ ID N°: 23.

15 En un tercer aspecto de la presente invención, se proporciona en ella un oligonucleótido que comprende al menos 15 bases consecutivas de la DNA designada SEQ ID N°: 28, o un recocido equivalente de la misma, en la que dicho oligonucleótido es capaz de hibridización específica en condiciones de PCR a una secuencia-blanco complementaria al menos a dichas 15 bases consecutivas, y el citado oligonucleótido es adaptado para iniciar la extensión del DNA durante PCR.

20 El oligonucleótido comprende preferentemente la secuencia designada SEQ ID N°: 28. Como alternativa, el oligonucleótido se elige en el grupo formado por SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20; SEQ ID N°: 22; y SEQ ID N°: 24.

25 En un otro aspecto de la presente invención, se proporciona en ella un oligonucleótido que comprende al menos 15 bases consecutivas de la DNA designada SEQ ID N°: 25, o un recocido equivalente de la misma, y un segundo iniciador que comprende al menos 15 bases consecutivas de la secuencia de DNA SEQ ID N°: 26, o un recocido equivalente de la misma.

30 El citado par de iniciadores de la PCR comprende preferentemente un iniciador que incluye la secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 25, y un segundo iniciador que comprende la secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 26. Como alternativa, dicho par de iniciadores de la PCR comprende una de las SEQ ID N°:9; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 13; o SEQ ID N°: 15, y una de las SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 14 o SEQ ID N°: 16.

35 En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona en ella un oligonucleótido que comprende al menos 15 bases consecutivas de la DNA designada SEQ ID N°: 27, o un recocido equivalente de la misma, y un segundo iniciador que comprende al menos 15 bases consecutivas de la secuencia de DNA SEQ ID N°: 28, o un recocido equivalente de la misma.

40 El citado par de iniciadores de la PCR comprende preferentemente un iniciador que incluye la secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 27, y un segundo iniciador que comprende la secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 28. Como alternativa, dicho par de iniciadores de la PCR comprende una de las SEQ ID N°:17; SEQ ID N°: 19; SEQ ID N°: 21; o SEQ ID N°: 23, y una de las SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20; SEQ ID N°: 22 o SEQ ID N°: 24.

Dichos pares de iniciadores PCR, tal como aquí se describen, se encuentran preferentemente adaptados para amplificar regiones especificadas del rDNA de la *Eimeria* de manera específica para cada género.

45 En otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un procedimiento para identificar *Eimeria* en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento los pasos de:

proporcionar una muestra que comprenda el DNA de modelo genómico que debe ensayarse;

50 proporcionar el DNA genómico de uno o más patrones de identidad conocida;

proporcionar un par de iniciadores de la PCR seleccionados en el grupo consistente en:

55 (i) iniciadores que comprenden al menos 15 bases consecutivas de la secuencia de DNA designadas SEQ ID N°: 25 y SEQ ID N°: 26 o los equivalentes recocidos de las mismas; o

(ii) iniciadores que comprenden al menos 15 bases consecutivas de la secuencia de DNA designadas SEQ ID N°: 27 y SEQ ID N°: 28 o los equivalentes recocidos de las mismas;

60 amplificar por medio de PCR una región del DNA del modelo utilizando el citado primer par para producir uno o más productos de la PCR de dicha muestra, y el citado o más patrones de identidad conocida;

65 comparar el producto o los productos de la PCR derivados de dicha muestra contra uno o más productos de la PCR del patrón o de los patrones de identidad conocida; e identificar las especies de *Eimeria* presentes en la muestra.

El citado par de iniciadores de la PCR comprende preferentemente los iniciadores que incluyen las secuencias designadas SEQ ID N°: 25 y SEQ ID N°: 26. Como alternativa, dicho par de iniciadores de la PCR comprende una de

ES 2 266 167 T3

las SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 13; o SEQ ID N°: 15 y una de las SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 14 o SEQ ID N°: 16.

5 Como variante, dicho par de iniciadores de la PCR comprende preferentemente los iniciadores que incluyen las secuencias designadas SEQ ID N°: 27 y SEQ ID N°: 28. Como alternativa, dicho par de iniciadores de la PCR comprende una de las SEQ ID N°: 17; SEQ ID N°: 19; SEQ ID N°: 21; o SEQ ID N°: 23 y una de las SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20; SEQ ID N°: 22 o SEQ ID N°: 24.

10 Por cada muestra que debe ensayarse se ejecutan preferentemente dos PCR, utilizando cada PCR un par de iniciadores diferentes.

Como alternativa, se efectúa una PCR por cada muestra que debe ensayarse y a los dos pares de iniciadores se les proporciona dicha única PCR.

15 Los citados producto o productos de la PCR derivados de dicha muestra se comparan preferentemente contra el producto o productos de la PCR del patrón o de los patrones de identidad conocida por medio de electroforesis en gel.

20 La electroforesis en gel es preferentemente la DPGE. Como alternativa, la electroforesis por gel es la SSCP. Como variante, pueden emplearse tanto la DPGE como la SSCP.

La electroforesis en gel se realiza preferentemente en un sistema automatizado.

25 En otro aspecto más de la presente invención, en ella se proporciona el uso de cualquiera de los oligonucleótidos aquí descritos o los equivalentes recodados de los mismos para la identificación de las especies de *Eimeria*.

Figuras

30 Éstos y otros aspectos de la presente invención, que deben ser considerados en todos sus aspectos novedosos, se harán evidentes por la descripción que sigue, que se presenta únicamente a título de ejemplo, con referencia a las figuras adjuntas, en las cuales:

35 Figura 1 ilustra la secuencia ITS-1 de la *E. tenella* (SEQ ID N°: 1) amplificada con un par de iniciadores WW1 y WWW3r (representado en cursiva); la secuencia subrayada representa el ITS-1 y la secuencia de texto normal el extremo 3' del rDNA 18S y el extremo 5' del rDNA 5.8S;

Figura 2 ilustra la secuencia ITS-2 de la *E. tenella* (SEQ ID N°: 2) amplificada con un par de iniciadores WW2 y WWW4r (representado en cursiva); la secuencia subrayada representa el ITS-2 y la secuencia de texto normal el extremo 3' del rDNA 5.8S y el extremo 5' del rDNA 28S;

40 Figura 3 gel de agarosa mostrando los productos de la PCR de ITS-1 o ITS-2 y que representan las especies *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix*, *E. tenella* (A, B, M, N y T, respectivamente). DNA de pollos y ningún control de DNA (C y - respectivamente);

45 Figura 4 análisis por DPGE de los productos de la PCR de ITS-1 o ITS-2 amplificados a partir de múltiples aislados de oocistos, representando cinco especies de *Eimeria* de pollos, por el orden siguiente: *E. acervulina* (aislados A7, A2, A12 y A3), *E. brunetti* (aislados B1 y B5), *E. maxima* (aislados M1 y M2), *E. necatrix* (aislados N1, N5 y N10), y *E. tenella* (aislados T6, T5, T7, T3 y T4) (véase la Tabla 1).

50 Figura 5 análisis por SSCP de los productos de la PCR de ITS-1 o ITS-2 amplificados a partir de múltiples aislados de oocistos, representando cinco especies de *Eimeria* de pollos, por el orden siguiente: *E. acervulina* (aislados A7, A2, A12 y A3), *E. brunetti* (aislados B1 y B5), *E. maxima* (aislados M1 y M2), *E. necatrix* (aislados N1, N5 y N10), y *E. tenella* (aislados T6, T5, T7, T3 y T4) (véase la Tabla 1);

55 Figura 6 capacidad del enfoque de la DPGE para detectar específicamente especies múltiples de *Eimeria* dentro de las muestras. El Panel A muestra la detección de la *Eimeria maxima* en presencia de un exceso de *E. acervulina* (DNA de los aislados A7 a M1 mezclados en proporciones de $1:10^{-1}$, $1:10^{-2}$, $1:10^{-3}$ y $1:10^{-4}$). El Panel B presenta la detección de una especie particular (segundo aislado) en presencia (+) de un exceso de 100x de DNA de una especie heteróloga (primer aislado), para todas las posibles combinaciones de especies presentadas: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. tenella* representadas por los aislados A7, B1, M1, N1 y T6, respectivamente (véase la Tabla 1);

60 Figura 7 gel de agarosa (arriba) y gel de DPGE (abajo) mostrando los productos de la PCR de ITS-2 amplificados a partir de aislados de oocistos que representan siete especies diferentes de *Eimeria* de pollos. Líneas: *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. tenella* (A, B, M, μ , N, P y T, respectivamente) (véanse las Figuras 3 y 4). Los aislados representados son los A7, B1, μ 2, N1, P4 y T6 (véase la Tabla 1);

Figura 8 cromatogramas que representan los productos de la PCR de ITS-2, marcados con fluorescencia, amplificados a partir de siete especies de *Eimeria* de pollos (representando las líneas A, B, M, μ , N, P y T las especies

E. acervulina, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. necatrix*, *E. praecox* y *E. tenella*, respectivamente) y tres aislados australianos de pollos de granja que contienen especies mezcladas de *Eimeria* (líneas X9, X15 y X7, véase la Tabla 2). Los productos se separaron en un gel de DPGE en un secuenciador automatizado de DNA 377 (Applied Biosystems, EE.UU.) y los cromatogramas generados por el software GeneScan® 3.1. Para cada *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. tenella*, no se detectaron entre las muestras diferencias apreciables en el número y posición de los picos de los perfiles del cromatograma (no ilustrada), aunque se detectó una cierta variación en la intensidad relativa del pico en algunas muestras que representaban una especie. Tanto para la *E. mitis*, como para la *E. praecox*, se observaron algunas diferencias en la posición de los picos menores, como indicación de la variación de la población (véase la Figura 9). Aunque se produjo una cierta superposición en los perfiles entre las especies *E. brunetti*, *E. mitis* y *E. praecox*, se pudieron definir los picos cromatográficos propios de cada especie para cada una de las siete especies de *Eimeria* (asteriscos), facilitándose la identificación de las especies presentes en los “aislados de granja” (significando las etiquetas A, B, M, μ , P y T picos que representaban la *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis*, *E. praecox* y *E. tenella*, respectivamente; véase la Tabla 2). Los aislados monoespecíficos representados son los A7, B1, M1, μ 2, N1, P4 y T6 (véase la Tabla 1); y

Figura 9 cromatogramas que representan productos de la PCR de ITS-2 marcados por fluorescencia, amplificados a partir de cepas diferentes de *E. mitis* y *E. praecox*. Los productos se separaron en un gel DPGE, en un secuenciador automatizado de DNA 377 (Applied Biosystems, EE.UU.) y los cromatogramas se generaron por el programa de software GeneScan® 3.1. Tanto para la *E. mitis* como para la *E. praecox*, se detectaron variaciones en las posiciones de los picos menores, que indicaba variación en la población. Las cepas de *E. mitis* representadas son: Beerwah, Jorgensen, Kelly y Redlands (aislados μ 3, μ 4, μ 2 y μ 5, véase la Tabla 1), y las cepas de *E. praecox* son: MCK, y ARI (aislados P2 y P4, véase la Tabla 1).

Realización preferida

A continuación se describen las formas preferidas de la presente invención, presentadas en términos generales en relación con la aplicación de los nuevos oligonucleótidos aquí descritos a un procedimiento para identificar las distintas especies de *Eimeria*. La invención se hará aún más clara por la exposición que se contiene en el capítulo “Base Experimental de la Invención” siguiente, que proporciona ejemplos de formas preferidas de la invención.

Aunque la invención aquí descrita se dirige básicamente al uso de nuevos oligonucleótidos como iniciadores en las PCRs específicas de cada género, se comprenderá fácilmente que cualquiera de los oligonucleótidos aquí descritos podrían utilizarse de modo alternativo con el fin de identificar las especies de *Eimeria*.

A lo largo de toda esta memoria, salvo que el contexto exija otra cosa, la palabra “comprenden” y sus variaciones tales como “comprende” y “que comprende” se entenderá de manera que impliquen la inclusión de un entero o paso expresado o un grupo de enteros o pasos, pero no la exclusión de cualquier otro entero o paso, o de grupo de enteros o pasos.

Tal como aquí se utiliza, el término “género” se usa para hacer referencia una posición principal en la jerarquía taxonómica, que se sitúa por debajo del nivel de la familia y por encima del nivel de la especie; el término “especies” se usa para hacer referencia a una posición fundamental en la jerarquía taxonómica que se encuentra por debajo del nivel del género e indica el límite de organismos capaces de entrecruzarse entre sí; y “cepas” se usa para hacer referencia a un nivel taxonómico inferior al nivel de la especie, y que podría indicar la variación de la población dentro de una especie. En consecuencia, las PCRs mencionadas como “propias de cada especie” son las que se encuentran adaptadas para amplificar regiones designadas del DNA de una especie única solamente. Las PCRs citadas como “específicas de cada género” están adaptadas para amplificar regiones designadas del DNA de una serie de especies dentro de un género particular.

En una forma preferida de la presente invención, muestras fecales obtenidas de pollos se procesan de manera que se aísle el DNA genómico de cualquier elemento parasitario presente en la muestra. Se comprenderá que es posible utilizar cualquier procedimiento adecuado para el aislamiento del DNA genómico de la *Eimeria*; no obstante, un procedimiento preferido se describe en el capítulo titulado “Base Experimental de la Invención; 1: Parásitos y Aislamiento del DNA Genómico”.

Básicamente, el DNA aislado tal como arriba se ha indicado se utiliza posteriormente en la invención como modelo en una PCR utilizando cualquiera de los nuevos pares de iniciadores de PCR de la invención; WW1 (SEQ ID N°: 25) y WWW3r (SEQ ID N°: 26), o, WW2 (SEQ ID N°: 27) y WWW4r (SEQ ID N°: 28). Las secuencias de cada uno de estos iniciadores se proporciona bajo el subtítulo “Base Experimental de la Invención; 2: Amplificación Enzimática del rDNA” y la posición de cada uno de los iniciadores en relación con la ITS-1 e ITS-2 del rDNA de la *Eimeria* se representa en las Figuras 1 y 2, respectivamente. Los pares de iniciadores de la presente invención permiten la amplificación en PCR específica de cada género del DNA de la ITS de la *Eimeria*, por lo que cada par puede aplicarse a cualquier muestra de lo que se sospecha puede ser coccidia y a la identificación de cualquier número de especies diferentes dentro del género *Eimeria*.

Según la invención, un iniciador de PCR (o un iniciador de oligonucleótido) es un oligonucleótido capaz de hibridación específica en condiciones particulares de la PCR a una región del DNA de modelo, que tiene una secuencia prácticamente complementaria con la secuencia del iniciador, y adaptada para iniciar la extensión del DNA durante la

ES 2 266 167 T3

PCR. Se comprenderá que una secuencia complementaria es capaz de formar enlaces Watson-Crick con su complemento, en el que la adenina se aparea con la timina o la guanina con la citosina. Cada iniciador se utiliza típicamente como miembro de un par de iniciadores, incluido un iniciador previo 5' que se hibridiza con el extremo 5' del DNA de modelo que debe amplificarse y un iniciador posterior 3' que se hibridiza con el complemento del extremo 3' del DNA de modelo que debe amplificarse.

Los que tienen un conocimiento normal de la técnica a la que se refiere la invención entenderán que el término de “prácticamente complementario”, tal como aquí se utiliza, significa que el iniciador podría no tener una complementariedad al 100% con su secuencia modelo-blanco, pero a pesar de ello es capaz de recocido con la misma de manera específica en condiciones apropiadas de recocido de la PCR.

Los iniciadores de la presente invención pueden ser preparados por cualquiera de los procedimientos clásicos de síntesis del DNA. En el caso que nos ocupa, los iniciadores fueron fabricados y adquiridos comercialmente a GeneWorks Pty Ltd, PO Box 11, Rundle Mall, Adelaida, SA 5000, Australia.

De acuerdo con la realización preferida, se han obtenido resultados óptimos utilizándose iniciadores de idéntica longitud y secuencia que los iniciadores WW1 y WW3r y/o WW2 y WW4r, tal como se ha indicado anteriormente. No obstante, una persona que tenga un conocimiento ordinario de esta técnica reconocerá que es posible efectuar modificaciones en los iniciadores sin dejar de mantener la especificidad en cuanto al género de la amplificación de la PCR y la eficacia del procedimiento diagnóstico de la presente invención.

En primer lugar, es posible variar la longitud de los iniciadores. Por ejemplo, la presente invención contempla que podrían ser adecuados iniciadores más cortos que contengan al menos 15 bases consecutivas de las secuencias de nucleótidos de estos iniciadores. De igual manera, los iniciadores podrían ser prolongados. El límite superior exacto de la longitud de los iniciadores no es crítico. Sin embargo, los iniciadores serán normalmente inferiores o iguales a unas 30 bases, y preferentemente inferiores o iguales a 26 bases. A título de ejemplo, se considera que el iniciador WW1 podría extenderse hasta un máximo de 10 nucleótidos a partir de su extremo 3' (TCT AAA CGA T), (SEQ ID N°: 3). El WW2 podría extenderse hasta 4 nucleótidos en su extremo 5' (CAGC), (SEQ ID N°: 4). El WW3r podría extenderse hasta 5 nucleótidos en su extremo 3' (GTT TT), (SEQ ID N°: 5) o hasta 10 nucleótidos desde su extremo 5' (ATG CGT GAG C), (SEQ ID N°: 6) y WW4r podría extenderse hasta 10 nucleótidos en cualquiera de ambos extremos (el extremo 3' ACT GAT TTC A, (SEQ ID N°: 7) y el extremo 5' TGA TAT GCT T, (SEQ ID N°:8)). Además, los fragmentos de nucleótidos no complementarios podrían igualmente fijarse al extremo 5' de los iniciadores, aumentando eficazmente su longitud.

En segundo lugar, la presente invención contempla cambios menores (o modificaciones conservadoras) en la secuencia de los iniciadores que no modifican sustancialmente su capacidad para recocer a su DNA-blanco específico, y posteriormente iniciar la extensión durante la PCR. Por ejemplo, cualquier nucleótido determinado, o serie de nucleótidos, de un iniciador podrían ser sustituidos por nucleótidos alternativos, que podrían no permitir el apareado de la base de Watson-Crick en el lugar concreto de modificación al recocerse el iniciador al DNA del modelo durante la PCR, pero no afectar sustancialmente por ello la capacidad del iniciador de iniciar la extensión de la PCR. A estos iniciadores alternativos podría denominárseles “equivalentes de recocido” de los iniciadores WW1, WW3r, WW2 o WW4r y sus variantes, tal como aquí se describe. Estos equivalentes de recocido tendrán al menos 15 nucleótidos de longitud y estarán adaptados para recocerse a una secuencia-blanco en condiciones adecuadas de recocido de la PCR. En general, las condiciones apropiadas de recocido de la PCR para dichos equivalentes de recocido incluyen el uso de una mezcla de reacción o tampón de la PCR que tenga 3-7 mM MgCl₂. Se considera que para la mayoría de equivalentes de recocido, podrían ser apropiadas temperaturas de recocido de entre 45 y 52°C. A título de ejemplo adicional, Si se modificaran 5 nucleótidos con una determinada secuencia de iniciadores, de la manera descrita en este párrafo, y dichas modificaciones se extendieran centralmente a través de la secuencia de iniciadores, es probable que la temperatura preferida de recocido de dicho iniciador se redujera en aproximadamente 5°C. Una secuencia-blanco, en el sentido de este párrafo, significa una secuencia que es complementaria de al menos 15 bases consecutivas de la secuencia de cualquiera de los iniciadores WW1, WW3r, WW2 o WW4r.

Se comprenderá que la utilidad de cualquier conjunto alternativo de iniciadores de PCR alrededor de WW1 y WW3r, y/o WW2 y WW4r, de la presente invención, podría evaluarse, al menos teóricamente, con el uso del programa de software apropiado y de información sobre la secuencia del DNA de la ITS-1 e ITS-2 y de la región adyacente. Estos paquetes de software incluyen, por ejemplo, el PC Oligo5 (National Bioscience Inc.) o el Amplify (Universidad de Wisconsin).

Entre los ejemplos de variaciones de los iniciadores WW1, WW3r, WW2 y WW4r que podrían ser apropiados para la presente invención, se incluyen:

TABLA 1A

Variaciones de WW1 (5'-3')	Variaciones de WW3r (5'-3')
AGTTGCGTAAATAGAGCCC (SEQ ID NO: 9)	AAGACATCCATTGCTGAAA (SEQ ID NO: 10)
AAGTTGCGTAAAG AGCC (SEQ ID NO: 11)	CAAGACATCCATTGC TGAA (SEQ ID NO: 12)
AAGTTGCGTAAATAGAGC (SEQ ID NO: 13)	CAAGACATCCATTGCTGA (SEQ ID NO: 14)
TTGCGTAAATAGAGCCC (SEQ ID NO: 15)	GACATCCATTGCTGAAA (SEQ ID NO: 16)

Variaciones de WW2 (5'-3')	Variaciones de WW4r (5'-3')
CGTCTGTTTCAGTGTCT (SEQ ID NO: 17)	AATTCAGCGGGTAACCTCG (SEQ ID NO: 18)
ACGTCTGTTTCAGTGTC (SEQ ID NO: 19)	AAATTCAGCGGGTAACCTC (SEQ ID NO: 20)
ACGTCTGTTTCAGTG CT (SEQ ID NO: 21)	AAATTCAGCGGGTAACCT (SEQ ID NO: 22)
GTCTGTTTCAGTGTCT (SEQ ID NO: 23)	TTCAGCGGGTAACCTCG (SEQ ID NO: 24)

Aunque los nuevos oligonucleótidos o iniciadores y sus variantes aquí expuestos han sido diseñados para permitir una amplificación de la PCR específica del género de las regiones de ITS-1 e ITS-2, se comprenderá que podrían igualmente aplicarse, individualmente o combinados, a otras varias aplicaciones. Por ejemplo, podrían utilizarse como sondas moleculares o iniciadores para técnicas alternativas de diagnóstico (tales como la LCR, la reacción de la cadena de ligasa o la PCR cuantitativa). Los que conocen esta técnica comprenderán fácilmente los medios por los que pueden efectuarse tales aplicaciones con el uso de una metodología estándar en la técnica.

En general, para identificar las especies de *Eimeria* presentes en una muestra sólo se necesitará una PCR, que utilice un único conjunto de cebador e iniciadores. No obstante, se comprenderá que habrá ocasiones en las que podría utilizarse una PCR paralela, que use el segundo conjunto de iniciadores, con el fin de aclarar aún más la identidad de una especie presente en una muestra. De la misma manera, una vez optimizadas las condiciones de la PCR, los dos conjuntos nuevos de iniciadores podrían utilizarse en una única PCR.

Para que los productos de la PCR puedan ser posteriormente detectados, los iniciadores se etiquetan preferentemente en el extremo con [γ -³³P]ATP. Como alternativa, podrían utilizarse otros medios de etiquetado de los productos de la PCR; por ejemplo, la incorporación de [α -³²P]dNTPs durante la amplificación por PCR. Más preferentemente, podrían emplearse sistemas de etiquetado no radiactivos, que utilicen digoxigenina, biotina y similares. Estos sistemas no radiactivos de etiquetado son ya perfectamente conocidos en la técnica y, en consecuencia, podrían ser aplicados fácilmente por una persona con conocimientos normales. Sin embargo, proporcionamos aquí un ejemplo bajo el título de "Base Experimental de la Invención - 7: Ejemplo del uso de la Detección Electroforética basada en la Fluorescencia". Se comprenderá que la etiqueta no radiactiva podría utilizarse para etiquetar el extremo de un iniciador determinado o bien incorporarse al iniciador y/o al producto de la PCR.

Cada PCR se ejecuta con al menos una muestra de control monoespecífica o un patrón de identidad conocida en cuanto a la especie. Es fácil comprender que podrían presentarse muestras de control que contengan más de una especie conocida. Los controles negativos en los que no se encuentra presente ningún DNA del modelo de la *Eimeria* se realizan también contra las muestras. Es fácil entender que podrían ejecutarse igualmente contra las muestras otros controles estándar utilizados habitualmente en esta técnica.

El DNA genómico de la *Eimeria* del control o los patrones de especies conocidas de *Eimeria* podrían purificarse de manera similar al DNA genómico de muestras desconocidas. Por ejemplo, para esta finalidad podrían utilizarse las líneas de laboratorio de identidad *Eimeria* conocida obtenidas de Medichick Laboratories (Australia) o del Animal Research Institute of the Queensland Department of Primary Industries (Australia).

La amplificación se realiza de acuerdo con los procedimientos habituales en la técnica a la que se refiere esta invención, por ejemplo, tal como se describe en la Patente de los EE.UU. N° 4.683.202. Las PCRs del patrón según la invención incluyen preferentemente 0.1 μ -1 μ M de cada iniciador, 200 μ M de cada dNTP, 3-7 mM MgCl₂, y 1U *Taq* DNA de polimerasa (Promega). Cada PCR recibe habitualmente encima aceite mineral u otro producto similar para impedir la evaporación de la mezcla de reacción durante el ciclo. El ciclo de la PCR se ejecuta preferentemente en las

ES 2 266 167 T3

condiciones siguientes: desnaturalización a una temperatura de 94°C durante unos 15 a 30 segundos, recocido a una temperatura de 45 a 60°C durante 15 a 30 segundos y extensión a una temperatura de 72°C durante 15 a 30 segundos. Preferentemente se realizan de 30 a 35 ciclos. Más concretamente, para los pares preferidos de iniciadores WW1 y WW3r, y WW2 y WW4r, de la invención, se podrían utilizar las siguientes condiciones de la PCR:

5

Desnaturalización	Recocido	Extensión	Ciclos
94°C, 30 segundos	45°C, 30 segundos	72°C, 30 segundos	30
94°C, 30 segundos	50°C, 30 segundos	72°C, 30 segundos	30
94°C, 30 segundos	60°C, 30 segundos	72°C, 30 segundos	30
94°C, 15 segundos	60°C, 15 segundos	72°C, 30 segundos	30

10

15

Cualquiera que tenga un conocimiento básico de esta técnica, comprenderá que las condiciones de la PCR que aquí se exponen representan simplemente un ejemplo, y podrían ser variadas a fin de optimizar las condiciones cuando, por ejemplo, se utilicen elementos de ciclo de PCR alternativa o polimerasas del DNA, cuando difiere la calidad del DNA-modelo, o si se utilizan modificaciones de los iniciadores que no se presentan aquí específicamente como ejemplos, sin apartarse por ello del ámbito de la presente invención. Las condiciones de la PCR podrían ser modificadas u optimizadas cambiándose la concentración de los diversos constituyentes dentro de la reacción y/o cambiándose los constituyentes de la reacción, modificándose el número de ciclos de amplificación, los tiempos o temperaturas de desnaturalización, recocido o extensión, o la cantidad de DNA de modelo, por ejemplo. Los que conocen la técnica comprenderán que existen otros muchos medios de optimizar las condiciones de la PCR a fin de superar la variabilidad entre reacciones. Las condiciones de la PCR podrían optimizarse por análisis de rutina basado en los factores arriba mencionados que ya son conocidos habitualmente en la técnica.

30

35

Se entenderá que cuando no se presentan aquí ejemplos específicos, las temperaturas apropiadas de recocido de la PCR para cualquier iniciador, dentro del ámbito de la presente invención, podrían derivarse a partir de la temperatura calculada de fusión de dicho iniciador. Estas temperaturas de fusión podrían calcularse con el uso de fórmulas estándar, como las descritas en Sambrook, 1989. Como comprenderá cualquiera que tenga conocimientos normales en la técnica a la que se refiere esta invención, las temperaturas de recocido podrían encontrarse por encima o por debajo de la temperatura de fusión pero, en general, podría ser adecuada una temperatura de recocido de aproximadamente 5°C por encima de la temperatura de fusión calculada del iniciador.

40

45

Los productos de la PCR, obtenidos a partir de la amplificación de las regiones de ITS-1 e ITS-2 tanto de muestras desconocidas como de las muestras de control o patrones correspondientes de identidad conocida, podrían detectarse por separación electroforética. Las técnicas electroforéticas, que son particularmente sensibles a diferencias menores en el tamaño y/o secuencia del producto de la PCR son las preferidas. Por ejemplo, las técnicas de SSCP (polimorfismo de conformación de una sola cadena) y/o DPGE (electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizado) son particularmente adecuadas cuando las condiciones son óptimas, ya que tienen la capacidad de detectar cambios individuales de la base en la secuencia o la variación de longitud por un único nucleótido entre muestras. Además, estas técnicas se pueden aplicar fácilmente a la diferenciación de grandes números de muestras.

50

El análisis SSCP ha sido ya descrito (*Orita et al*, 1989). En general, cualquier producto concreto de la PCR podría separarse como moléculas de una sola cadena por electroforesis en gel de poliacrilamida no desnaturalizado. La técnica se basa en el hecho de que una molécula de un DNA de una sola cadena se pliega de forma diferente a otra de dichas moléculas, si difiere en la secuencia por una sola base o más; las diferencias en la estructura terciaria da lugar a diferencias en la movilidad durante la electroforesis.

55

60

Los que tienen unos conocimientos ordinarios de la técnica a la que se refiere esta invención entenderán que la estructura terciaria del DNA de una sola cadena cambia en condiciones físicas diferentes, por ejemplo, la temperatura y el entorno iónico. Como resultado, la sensibilidad del análisis SSCP depende de éstas y otras muchas condiciones similares, tales como la longitud del producto de la PCR. En el caso de la presente invención, sin embargo, se ha comprobado que se prefieren las condiciones siguientes, debiéndose apreciar que las condiciones pueden ser modificadas a fin de tener en cuenta las diferentes condiciones del laboratorio y del equipo; de 0,4 a 0,6x de MDE (ampliación de detección de mutaciones; FMC BioProducts), que contenga de 0,5 a 1,5x de TBE y electroforesis realizada a 7-40 W durante unas 17 horas a 15°C. Más concretamente, en la invención podrían utilizarse las condiciones siguientes:

65

ES 2 266 167 T3

	Gel	Potencia (W)	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)
5	0,5xMDE conteniendo 0,6xTBE	7	17	15
	0,4xMDE conteniendo 0,6xTBE	7	17	15
	0,6xMDE conteniendo 0,6xTBE	20	17	15
10	0,6xMDE conteniendo 0,6xTBE	30	17	15
	0,6xMDE conteniendo 0,6xTBE	40	17	15
	0,6xMDE conteniendo 0,5xTBE	20	17	15
15	0,6xMDE conteniendo 1,0xTBE	30	17	15
	0,6xMDE conteniendo 1,5xTBE	40	17	15

20

25 El análisis DPGE se ha descrito anteriormente y es ya conocido en la técnica a la que se refiere esta invención. En el DPGE, cada cadena de una molécula de DNA se separa de su cadena complementaria y se somete a un gel de poliacrilamida en condiciones de desnaturalización. En estas condiciones, las dos cadenas de cualquier molécula concreta de DNA se ven en la imposibilidad de re-hibridizarse entre sí durante la electroforesis, de manera que cada cadena individual migrará separadamente dentro del gel. El DPGE es un sistema sensible capaz de identificar diferencias en la longitud de dos moléculas cualesquiera de DNA para un único nucleótido.

30 En el caso del análisis DPGE, sin embargo, se prefieren las siguientes series de condiciones, como ocurre con las condiciones del análisis SSCP, aunque podrían modificarse para tener en cuenta otras muchas variables de laboratorio, sin apartarse por ello del ámbito de la presente invención: gel con un espesor de 0,4 mm de un 4 a un 6% de poliacrilamida, conteniendo un 42% de urea y 1xTBE, sujeto a electroforesis de 20 a 50 W durante unas 4 horas a 40°C. Más concretamente, en la presente invención podrían utilizarse las condiciones siguientes:

35

	Gel (poliacrilamida)	Potencia (W)	Tiempo (horas)	Temperatura (°C)
40	0,4 mm de espesor (6%) conteniendo 42% de urea y 1xTBE	40	4	40
	0,4 mm de espesor (4%) conteniendo 42% de urea y 1xTBE	40	4	40
45	0,4 mm de espesor (5,5%) conteniendo 42% de urea y 1xTBE	40	4	40
	0,4 mm de espesor (5%) conteniendo 42% de urea y 1xTBE	20	4	40
50	0,4 mm de espesor (5%) conteniendo 42% de urea y 1xTBE	30	4	40
55	0,4 mm de espesor (5%) conteniendo 42% de urea y 1xTBE	50	4	40

60 Conviene señalar que el DPGE es el sistema preferido para la identificación de especies, mientras que el SSCP se prefiere para la detección de la variación de la población dentro de una especie, aunque ambas técnicas pueden aplicarse a la identificación de especies. Así, se comprenderá que, para efectuar la identificación o el diagnóstico de las especies *Eimeria* podrían utilizarse independientemente cualquiera de los análisis SSCP o DPGE. Sin embargo, la presente invención contempla igualmente el uso de ambas técnicas en paralelo con el fin de conseguir un mejor conocimiento de la identidad de las especies de *Eimeria* dentro de una determinada muestra. De la misma manera, la presente invención considera el uso de otras técnicas complementarias, tales como la electroforesis en gel de agarosa y el secuenciamiento del DNA.

Después de separación de los productos de la PCR a través de electroforesis, pueden tratarse los geles de acuerdo con las técnicas estándar (por ejemplo, en el caso de los geles de poliacrilamida, secándose sobre papel de filtro o secante) y someterse a autorradiografía durante un tiempo apropiado para poder demostrar la posición de las bandas del producto de la PCR sobre un gel.

5

La metodología de la presente invención se adapta preferentemente a un sistema electroforético automatizado (basado en la fluorescencia); por ejemplo, un aparato automatizado de secuencia de Applied BioSystems (ABI) acoplado a un hardware y software de ordenador apropiados. De este modo, podrían registrarse las “huellas dactilares” específicas de cada especie individual de *Eimeria*, almacenarse (para fines de protocolo e información) y compararse contra muestras patrón de especies ya conocidas. Estos procedimientos electroforéticos son procedimientos estándar que se utilizan comúnmente y conocen los entendidos en esta técnica en general. No obstante, en esta memoria se proporcionan ejemplos específicos de uno de dichos sistemas: “Base Experimental de la Invención - 7: Ejemplo de Uso de la Detección Electroforética basada en la Fluorescencia”.

10

Es fácil comprender que, cuando en la presente invención se utiliza un sistema automatizado, podría ser necesario variar las condiciones estándar generalmente aplicables al SSCP y DPGE manual, a fin de adaptarse al sistema automatizado concreto utilizado. Las condiciones apropiadas podrían determinarse fácilmente siguiéndose las instrucciones del fabricante y los ensayos de optimización de rutina según el mismo, y tal como se usan habitualmente en la técnica.

15

20 Base experimental de la invención

1 Parásitos y aislamiento del DNA genómico

Unos aislados australianos de *Eimeria* (que representaban líneas monoespecíficas; Tabla 1) fueron pasados a pollos libres de patógeno específico (SPF) mantenidos en aisladores construidos a propósito, en condiciones exigentes para impedir la contaminación cruzada. Los aislados fueron identificados en cuanto a las especies basándose en la morfometría de los oocistos esporulados, el período prepatente y la localización de graves lesiones en el intestino o intestinos. Para eliminar la posible contaminación de aislados con una o más especies heterólogas, se sometió a secuencia el gen rRNA 18S, que proporciona también identificación a nivel de especie (Barta *et al.*, 1997), a partir de los productos de la PCR derivados de aislados seleccionados de oocistos (véase el párrafo 4 siguiente). Las secuencias 18S determinadas para cada especie individual tenían una identidad al 99-100% con las publicadas recientemente por otros investigadores (Barta *et al.*, 1997).

25

30

Para cada aislado, se recogieron las heces de grupos de pollos, y se permitió que se esporularan los oocistos de *Eimeria*, bajo aireación constante a 30°C durante un mínimo de 48 horas. Los oocistos se aislaron utilizando NaCl saturado (Shirley *et al.*, 1995), se lavaron a fondo en volúmenes de 50 ml de H₂O y se prepararon en una suspensión acuosa final (10 ml que contenía 5x10⁶ oocistos). Los oocistos fueron acto seguido purificados con el uso de un procedimiento de centrifugación con gradiente de sacarosa (Gasser *et al.*, 1987), que eliminaba los componentes fecales inhibidores para la PCR, se lavaron (como anteriormente se ha indicado) y acto seguido se volvieron a suspender en 1 ml de H₂O. Se aisló el DNA de los oocistos utilizándose un kit de purificación del DNA genómico Wizard® (Promega, WI, EE.UU.). En breve, cada suspensión acuosa de oocistos se transfirió a un tubo de Eppendorf de 1,5 ml, se centrifugó a 13.000 g durante 5 min. y se volvió a suspender en 300 µl de Solución de Lisis de Núcleos (Promega, WI, EE.UU.). Se añadió un volumen igual de bolas de vidrio (de 2 mm de diámetro) y el tubo se hizo girar enérgicamente durante 3-5 minutos hasta que se habían roto más del 90% de los oocistos (evaluado por examen al microscopio ordinario de una pequeña sub-alcuota a un aumento de 400x). La suspensión que contenía esporocistos se transfirió entonces a un nuevo tubo de Eppendorf, se eliminaron las bolitas de cristal, se añadieron proteinasa K (150 µg ml⁻¹) y dodecil-sulfato sódico (5% peso/volumen), incubándose a continuación a 37°C hasta que se habían roto más del 90% de los esporocistos (-4 h). Este lisado se centrifugó entonces a 13.000 g durante 5 min. para convertir en gránulos los oocistos y las paredes de los esporocistos, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo. El DNA se purificó a partir del sobrenadante de acuerdo con el “protocolo del DNA de levadura” (Promega) y se eluyó en 50 µl de H₂O. Se comprobaron muestras individuales sobre geles de agarosa-tri-borato-EDTA (TBE = Tris-HCl 65 mM, ácido bórico 27 mM, EDTA 1 mM, pH 9, Bio-Rad, Richmond, CA, EE.UU.) coloreados con bromuro de etidio, utilizándose diluciones específicas del DNA fago λ (Promega, WI, EE.UU.) como marcadores, que se usaron igualmente para calcular aproximadamente las concentraciones de DNA. Se calculó que las cantidades de DNA genómico aislado individual (-5 x 10⁶ oocistos) fueron de 1-2,5 µg.

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 266 167 T3

TABLA 1

Aislados que representan diferentes especies de Eimeria. Todos los aislados se derivaron de grupos de pollos de Australia y se mantuvieron como líneas monoespecíficas. Las líneas MCK fueron facilitadas por Medichick Laboratories (Australia); las demás se obtuvieron del Animal Research Instituto del Departamento Queensland de Industrias Primarias (Australia)

Aislado	Especies	Descripción y origen geográfico en Australia
A7	<i>E. acervulina</i>	Línea RA atenuada derivada de una granja de Queensland [11]
A2	<i>E. acervulina</i>	Sexto paso de A7
A12	<i>E. acervulina</i>	Línea de laboratorio de 15 años de antigüedad (MCK) derivada de una granja de Victoria
A3	<i>E. acervulina</i>	Primer paso de A12
B1	<i>E. brunetti</i>	Línea atenuada (AM) derivada de una granja de Queensland
B5	<i>E. brunetti</i>	Quinto paso de B1
M1	<i>E. maxima</i>	Línea de laboratorio de 15 años de antigüedad (MCK) derivada de una granja de Victoria
M2	<i>E. maxima</i>	Segundo paso de M1
μ 2	<i>E. mitis</i>	Línea "Kelly" derivada de una granja de Queensland
μ 3	<i>E. mitis</i>	Línea Beerwah derivada de una granja de Queensland
μ 4	<i>E. mitis</i>	Línea Jorgensen derivada de una granja de Queensland
μ 5	<i>E. mitis</i>	Línea Redlands derivada de una granja de Queensland
N1	<i>E. necatrix</i>	Línea de laboratorio de 15 años de antigüedad (MCK) derivada de una granja de Victoria
N5	<i>E. necatrix</i>	Segundo paso de N1
N10	<i>E. necatrix</i>	Octavo paso de derivado atenuado de N1
P2	<i>E. praecox</i>	Línea MCK derivada de una granja de Victoria
P4	<i>E. praecox</i>	Línea ARI derivada de una granja de Queensland
T6	<i>E. tenella</i>	Aislado de campo (DARRYL) de Queensland
T5	<i>E. tenella</i>	Cuarto paso de T6
T7	<i>E. tenella</i>	Línea de laboratorio atenuada (Rt3+15)
T3	<i>E. tenella</i>	Cuarto paso de T7
T4	<i>E. tenella</i>	Línea de laboratorio de 15 años de antigüedad (MCK) derivada de una granja de Victoria

2 Amplificación enzimática del rDNA

Los iniciadores de oligonucleótidos se designaron a las regiones de las secuencias de genes del rRNA 18S, 5.8S y 28S, consideradas específicas del género *Eimeria*. La ITS-1 (más la secuencia lateral) se amplificó por PCR utilizando los iniciadores WW1 (adelante: 5'-AAG TTG CGT AAA TAG AGC CC-3') y WW3 (atrás: 5'-ACG TCT GTT TCA GTG TCT-3'), mientras que la ITS-2 se amplificó utilizándose los iniciadores WW2 (adelante: 5'-ACG TCT GTT TCA GTG TCT-3') y WW4r (atrás: 5'-AAA TTC AGC GGG TAA CCT CG-3'). El gen 18S se amplificó utilizándose los iniciadores WW5 (5'-ACC TGG TTG ATC CTG CCA G-3'), (SEQ ID N°: 29), y WW6r (5'-CCT

CCG CAG GTT CAC CTA CGG-3'), (SEQ ID N°: 30). Los iniciadores utilizados para amplificar las ITS-1 o las ITS-2 fueron marcados en el extremo con [γ - 33 P]ATP (NEN Life Science Products) utilizándose quinasa de polineucleótido T4 según el protocolo del fabricante (Promega, WI, EE.UU.). Las reacciones de la PCR se realizaron en volúmenes de 30 μ l con el liso de -50 ng de modelo, 50 pmol de iniciador, 200 μ l de cada dNTP, 7 mM MgCl₂ (para ITS-1) o 3 mM MgCl₂ (para ITS-2) y de polimerasa del DNA 1 U Taq (Promega, WI, EE.UU.) en las siguientes condiciones de termociclo: 94°C, 30 s (desnaturalización); 55°C, 30 s (recocido); 72°C, 30 s (extensión) durante 30 ciclos en un Thermal Cycler 480 de DNA (Perkin Elmer, EE.UU.). Las muestras de control sin DNA se incluyeron en cada ejecución de PCR. Por otra parte, se ensayó la especificidad de la PCR para los dos conjuntos de iniciadores con el uso de DNA (aproximadamente 100 ng) del músculo y heces de pollos (que se sabía que estaban libres de *Eimeria*), y no detectándose ningún producto de la PCR en ninguna de dichas muestras de control después de autorradiografía de geles DPGE durante 24 h.

Los productos individuales de la PCR se mezclaron con un volumen igual de tampón de carga (NaOH 10 mM, 95% de formamida, 0,05% de azul de bromofenol y 0,05% de xilen-cianol) verificándose su intensidad sobre geles de agarosa-TBE al 2,5% coloreados con bromuro de etidio, utilizándose la escala de 100 bp (Promega, WI, EE.UU.) como marcador del tamaño. La cantidad más baja de DNA de *Eimeria* requerida para una amplificación efectiva (para ambos conjuntos de iniciadores) y detección visual en geles de agarosa fue de -5 pg (representa aproximadamente 5-50 oocistos), lo que es similar a lo descrito en estudios anteriores (Stuck *et al.*, 1993; Schnitzler *et al.*, 1998; Moliroy *et al.*, 1998).

3 Electroforesis de alta resolución

Los productos de la PCR fueron desnaturalizados a 95°C durante 5 min. y enfriados rápidamente en un bloque congelado (-20°C) durante 2 min. antes de cargarlo en los geles. Para la DPGE, se cargaron 5 μ l de cada muestra en los pocillos de un gel de poliamida al 5% y 0,4 mm de espesor que contenía un 42% de urea y 1 x TBE, sometándose a electroforesis a 40 W durante 4 h a 40°C. Para el polimorfismo de conformación de una sola cadena (SSCP), se cargaron 3 μ l de cada muestra en los pocillos de un gel no desnaturalizado de 0,4 mm de espesor (0,6x MDE^{MR}), mejora de la detección de la mutación; FMC BioProducts, (Rockland, ME, EE.UU.) que contenían 0,6x TBE, efectuándose la electroforesis a 7 W durante 17 h a 15°C. La optimización fue tal como se describió anteriormente (Zhu y Gasser, 1998). Se realizaron ambos procedimientos electroforéticos en un dispositivo normal de secuencia (BaseRunner, IBI, New Haven, CT, EE.UU.). Los geles se secaron sobre papel secante y se sometieron a autorradiografía utilizándose película RP1 (Agfa).

4 Secuenciamiento del DNA

Los productos de la PCR se purificaron sobre columnas Preps de PCR Wizard[®] (Promega, WI, EE.UU.) y se eluyeron en 40 μ l de H₂O. Para secuenciar el gen del rRNA 18S, una cantidad alícuota (1 μ l) se sometió directamente a secuenciamiento-ciclo con el Sistema de Secuenciamiento-Ciclo del DNA *fmok*[®] (Promega, WI, EE.UU.) usándose los mismos iniciadores que para la PCR y una temperatura de recocido de 55°C. Para secuenciar la ITS-1, una alícuota de producto PCR purificado en columna (100 ng) se clonó en el vector plasmidial pGEM[®]-T (Promega, WI, EE.UU.) aislándose 12 clones (por producto de PCR) para secuenciamiento-ciclo.

5 Resultados

En geles de agarosa (Fig. 3), los tamaños de los productos de la PCR e ITS-1 variaron de 450 a 770 bp, mientras que los de la ITS-2 fueron de 370-620 bp (Tabla 2). Tanto para la ITS-1 como para la ITS-2, el tamaño o tamaños de las bandas fueron especiales para cada especie, dado que no se detectó ninguna variación intraespecífica en los perfiles de la banda entre aislados múltiples. En el caso de productos PCR de ITS-1, se detectó en una banda la *E. acervulina* y *E. tenella*, mientras que se resolvieron 2-3 bandas para las otras 3 especies (Tabla 2). Para los productos de la PCR ITS-2, se detectó una banda para *E. tenella*, apareciéndose 2 bandas para todas las demás especies (Tabla 2). La resolución de bandas múltiples de ITS en geles de agarosa para algunas especies indicó la existencia de diferentes tipos de secuencia dentro de un producto PCR. Esto se confirmó por secuenciamiento (a través de clonación) de los productos PCR de ITS-1 para muestras seleccionadas que representaban cada especie (A7, B1, M1, N1 y T6, Tabla 1) y comparación con secuencias previamente publicadas (Schnitzler *et al.*, 1998; Schnitzler *et al.*, 1999; Barta *et al.*, 1998). El secuenciamiento de (12 clones por especie) mostró que cada producto individual de PCR de ITS-1 representaba las especies apropiadas, aunque se detectaron nuevos tipos de secuencia ITS-1 (no representado) para las especies *E. brunetti*, *E. maxima* y *E. necatrix*.

Los análisis DPGE y SSCP se evaluaron entonces en cuanto a su capacidad para mostrar la variación de tamaño o secuencia en productos desnaturalizados de la PCR. Ambas técnicas permitieron la identificación inequívoca de todas las especies de *Eimeria* utilizándose productos de la PCR tanto ITS-1 como ITS-2 (Figuras 4 y 5). En cuanto al DPGE (Fig. 4), los perfiles de las bandas fueron relativamente simples, consistiendo cada uno en 2,5 bandas de una sola cadena, sin diferencias detectables en el número o tamaño de las bandas entre aislados múltiples de la misma especie. Como era de esperar, basándose en los resultados de la electroforesis sobre gel de agarosa (Tabla 2), ninguna banda que representaba una especie particular era compartida por las especies heterólogas. Aunque los perfiles de las bandas ITS-1 para la *E. acervulina* y *E. brunetti* eran similares, ambas especies pudieron ser más fácilmente distinguidas con el uso de la ITS-2. Por el contrario, las especies *E. necatrix* y *E. tenella* se distinguieron más fácilmente usándose el perfil de la ITS-1 en lugar del perfil de la ITS-2. En cuanto al ensayo SSCP (Fig. 5), los perfiles de las bandas

eran relativamente complejos, consistente cada uno en 6-15 bandas de una sola cadena (según la región de la ITS y la especie). Los perfiles complejos son el resultado de la formación de múltiples tipos de conformación de una o varias moléculas de una sola cadena. No se detectó ninguna variación en los perfiles de la ITS-1 ni de la ITS-2 entre aislados múltiples que representaban la misma línea de laboratorio para cualquiera de las cinco especies (véase la Tabla 1).
 5 Tampoco se detectaron diferencias entre múltiples líneas de laboratorios diferentes tanto para la especie *E. necatrix* como para la *E. tenella*. Por el contrario, se detectó una diferencia significativa en los perfiles de la ITS-1 y de la ITS-2 entre aislados que representaban las líneas RA y MCK de *E. acervulina*, que permanecieron indetectadas por DPGE (Fig. 1; líneas A7 y A2 frente a líneas A12 y A3). Esta diferencia estaba relacionada con el polimorfismo (o una diferencia de aproximadamente 1%) en las dos secuencias de ITS-1 e ITS-2 entre dichas líneas de laboratorio (datos no publicados).

Los resultados ilustrados en la Figura 7 son además un buen ejemplo de la eficacia del uso del enfoque del DPGE según la invención.

15

TABLA 2

Número y tamaños aproximados de productos de la PCR de ITS-1 e ITS-2 para las especies de *Eimeria*. Tamaños determinados en agarosa al 2,5% en 0,5x TBE por comparación con patrones de tamaño conocido. Los tamaños de producto de la PCR se interpolaron con el uso de una fórmula derivada por regresión lineal de patrones de peso molecular; comparados con el log. de su distancia de migración

ITS-1		
Especies	Número de bandas	Tamaños aproximados de las bandas (bp)
<i>E. acervulina</i>	1	520
<i>E. brunetti</i>	2	530, 580
<i>E. maxima</i>	3	450, 560, 610
<i>E. necatrix</i>	3	630, 715, 770
<i>E. tenella</i>	1	700

ITS-2		
Especies	Número de bandas	Tamaños aproximados de las bandas (bp)
<i>E. acervulina</i>	2	440, 490
<i>E. brunetti</i>	2	470, 550
<i>E. maxima</i>	2	370, 420
<i>E. necatrix</i>	2	590, 620
<i>E. tenella</i>	1	580

35

40

45

6 Especificidad del Ensayo - Especies Múltiples de *Eimeria* por Muestra

Dado que los pollos expuestos naturalmente a la *Eimeria* pueden alojar simultáneamente más de una especie del parásito (McDougald et al, 1997), es importante determinar la capacidad del procedimiento para detectar específicamente el DNA en muestras que contengan más de una especie. Esto se ensayó utilizándose la ITS-2 como ejemplo. A 20 ng de DNA genómico se añadieron 2 ng, 200 pg, 20 pg o 2 pg de DNA de una especie heteróloga (proporciones de 1: 10⁻¹, 1: 10⁻², 1: 10⁻³ o 1: 10⁻⁴). Las mezclas de plantilla de DNA se sometieron entonces a la PCR, los productos de la PCR se analizaron por DPGE y los geles fueron expuestos a película autorradiográfica (96 h). Por ejemplo, los resultados de la *E. acervulina* mezclada con diferentes proporciones de *E. maxima* se muestran en la Fig. 6A. Para una relación de modelo de 1: 10⁻⁴, se detectó una banda que representaba la primera especie, mientras que utilizándose una relación de modelo 1: 10⁻³ se detectaron débiles bandas que representaban la segunda especie en la mayoría de las muestras (no se han ilustrado todos los resultados). A una relación de dilución de 1: 10⁻², la especie presente a la menor concentración de DNA genómica se detectó para todas las combinaciones (Fig. 6B). Estos resultados indicaron que el DNA de una determinada especie podía detectarse por PCR, incluso en presencia de un exceso (100-1000 veces la cantidad) de modelo de una especie heteróloga. Además, se ha utilizado el DPGE de la ITS-2 (en una prueba ciega) para identificar correctamente todas las especies presentes en aislados de oocistos mezclados, indicando que esta técnica es útil para detectar las infecciones de los pollos por diversas especies mezcladas.

65

7 Ejemplo de uso de la Detección Electroforética basada en la Fluorescencia

Se dejó que oocistos de *Eimeria* se esporularan en las muestras fecales bajo aireación constante, a 30°C, durante un mínimo de 48 h. A continuación se aislaron con el uso de NaCl saturado (Shirley, 1995), se lavaron a fondo en volúmenes de 50 ml de H₂O y se preparó una suspensión acuosa final (10 ml que contenía 5 x 10⁶ oocistos). A continuación, se purificaron los oocistos sobre un gradiente de sacarosa (Gasser *et al.*, 1997), que permitió eliminar los componentes fecales que inhibían la PCR, se lavaron y se volvieron a suspender en 0,5 ml de H₂O. Se añadió un volumen igual de bolitas de vidrio (de 2 mm de diámetro) y el tubo se mezcló enérgicamente durante 3-5 min. hasta que se habían roto más del 90% de los oocistos (evaluado por examen en microscopio ordinario a un aumento de 400x). La suspensión conteniendo los esporocistos se transfirió entonces a un nuevo tubo de Eppendorf, se añadió proteinasa K (150 µg ml⁻¹) y dodecilsulfato sódico (5% peso/volumen), y acto seguido se incubó a 37°C durante la noche. El material sólido se granuló por centrifugación a 13.000 g durante 5 min., aislándose el DNA del sobrenadante con el uso de un Kit de Limpieza de DNA Wizard[®] (Promega, WI, EE.UU.).

La región de la ITS-2 (más la secuencia lateral) se amplificó en PCR para cada muestra individual de DNA genómico utilizándose los iniciadores WW2 y WW4r. El iniciador WW2 fue marcado en el extremo 5' con el colorante fluorescente, FAM (Fluoresceína). Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 25 µl que contienen normalmente de 1 a 20 ng de DNA modelo genómico, 50 pmol de iniciador, 200 µM de cada dNTP, MgCl₂ de 3 mM y DNA Taq 1 U polimerasa (Promega, WI, EE.UU.) en las siguientes condiciones de ciclo térmico: 94°C, 15 s (desnaturalización); 60°C, 15 s (recocido); 72°C, 30 s (extensión) durante 30 ciclos en un aparato de Ciclo Térmico de DNA 2400 (Perkin Elmer). Como reacciones de control se incluyeron también muestras sin DNA (no-DNA) o con DNA de pollo (purificado en cuanto al DNA de la *Eimeria*). La menor cantidad de modelo genómico a partir de la cual pudo amplificarse eficazmente la ITS-2 y que podía detectarse sobre un gel de agarosa se calculó en 100 a 1.000 pg (= X oocistos-equivalentes), incluso en presencia de un DNA en exceso de 1.000x de una especie heteróloga o del huésped (es decir, DNA muscular o fecal).

Las ampliaciones se examinaron, verificándose su intensidad sobre geles de agarosa al 2,5% coloreados con bromuro de etidio, utilizándose Tris-HCl 65 mM, ácido bórico 27 mM, EDTA 1 mM, pH9 (TBE) como tampón y una escala 100 bp (Promega, WI, EE.UU.) como marcador del tamaño. Acto seguido, cada muestra se diluyó a 1/4 con H₂O y 1,5 µl de la misma se mezcló con 2 µl de EDTA 4,1 mM, un 88,25% de formamida, 15 mg/ml de azul de dextrano (Promega) y 0,6 µl del patrón de tamaño GeneScan[®] -2.500 [TAMRA] (Applied Biosystems). Las muestras se desnaturalizaron a 25°C durante 2 min., se cargaron (2 µl) en un gel LongRanger[®] al 5% (FMC) en un Secuenciador de DNA ABI Prism^{MR} 377 (Applied Biosystems) y se sometieron a continuación a electroforesis a 200 W (3.000 V y 60 mA) durante 3,5 h. La imagen sobre gel resultante que representaba cada una de las muestras fue captada, analizándose los cromatogramas y comparándose con el uso del programa de software GeneScan[®] 3.1 (Applied Biosystems). Cada pico representaba la posición de la cadena de cada sentido para cada ampliación desnaturalizada. Se ajustó la escala de intensidad (eje vertical) de los cromatogramas, de manera que se mostrara la fluorescencia de fondo, por lo que no quedó sin detectar ninguno de los picos.

8 Resultados del Ejemplo de Estudio de Uso de Detección Electroforética basada en la Fluorescencia

Se prepararon dieciocho muestras de referencia de DNA que representaban aislados mono-específicos de oocistos de *Eimeria* (Tabla 1). Se amplificó el análisis electroforético sobre gel de agarosa de los productos de la PCR de la ITS-2 (individualmente) a partir de muestras mono-específicas, revelándose que se detectó una banda para *E. tenella*, mientras que aparecieron dos bandas para todas las demás especies (no ilustradas). La resolución de bandas múltiples sobre geles de agarosa para algunas especies indicó la existencia de diferentes tipos de secuencia dentro de una ampliación, algo que está de acuerdo con los hallazgos anteriores (Woods *et al.*, 2000 a, b). Esto se confirmó por secuenciamiento de ampliaciones clonadas de ITS-2 (secuenciamiento de 3 clones) de muestras seleccionadas (A7, B1, M1, N1 y T6) que representaban cada especie (véase la Tabla 1). Las secuencias de ITS-2 determinadas para aislados de M1 (*E. maxima*) y T6 (*E. tenella*) (Tabla 1) mostraron igualmente concordancia con las secuencias depositadas en GenBank^{MR} (números de acceso AF027722, AF027723, AF027724, AF027725, AF027726 y AF026388). Se detectaron algunos tipos nuevos de secuencia de la ITS-2 para las especies *E. mitis* y *praecox*, que no fue algo inesperado, dado que ningún estudio había examinado rigurosamente hasta ahora la variabilidad de las secuencias intra-específicas o intra-aislados en la región de la ITS-2.

Las ampliaciones producidas a partir de todas las muestras mono-específicas del DNA de *Eimeria* (Tabla 1) se analizaron entonces en el secuenciador automático. Los cromatogramas representativos se muestran en la Figura 8. Para cada una de las especies *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. necatrix* y *E. tenella*, no hubo diferencias apreciables en el número y situación de los picos en los perfiles de los cromatogramas entre muestras (se ilustran muestras seleccionadas), aunque se detectaron algunas diferencias en la intensidad relativa de los picos entre algunas muestras que representaban una especie (Figura 8). Para las dos especies *E. mitis* y *E. praecox*, se detectaron algunas diferencias en la posición o posiciones de picos menores, indicativo de la variación de la población (Figura 9). Independientemente de dicha variabilidad intra-específica en los perfiles cromatográficos, la posición del pico más alto/principal (señalado con una flecha) permaneció constante para todas las muestras de cada especie. Aunque hubo una cierta superposición en los perfiles entre *E. brunetti*, *E. mitis* y *E. praecox*, se pudieron definir picos cromatográficos específicos de cada especie para cada una de las siete especies de *Eimeria* (asteriscos en la Figura 8).

Dado que los pollos infectados naturalmente pueden alojar simultáneamente más de una especie de *Eimeria*, se estableció la capacidad del enfoque electroforético automático basado en fluorescencia para detectar específicamente el DNA de muestras que contenían más de una especie. Se ensayaron trece muestras “de campo” desconocidas, cada una de ellas derivadas de grupos de pollos múltiples (Tabla 3). Por comparación con las muestras de referencia (A6, B1, M1, μ 2, N1, P4 y T6), las composiciones de especies dentro de cada muestra individual pudieron determinarse fácilmente (Tabla 3 y Figura 8), incluso para las muestras que contenían *E. brunetti*, *E. mitis* y *E. praecox*, cuyos perfiles se superpusieron significativamente. Aunque la mayoría de las muestras fecales contenían múltiples especies, incluida la *E. praecox* y *E. mitis* (n = 1), *E. acervulina* y *E. mitis* (n = 1), *E. acervulina* y *E. praecox* (n = 2), *E. acervulina*, *E. brunetti*, *E. maxima*, *E. mitis* y *E. praecox* (n = 1), *E. acervulina*, *E. maxima* y *E. mitis* (n = 1), varias de las muestras contenían únicamente *E. praecox* (n = 4) o *E. mitis* (n = 1). Posteriormente, en un ensayo ciego, se evaluó la reproductibilidad del procedimiento para identificar correctamente todas las especies presentes en aislados recientes de oocistos, así como en muestras del DNA genómico deliberadamente mezcladas. No se detectaron variaciones significativas en los perfiles cromatográficos entre las diferentes pruebas efectuadas en días distintos, y las composiciones de especies de las muestras mezcladas fue la prevista. Estos resultados demostraron que la técnica es útil para detectar infecciones de una o varias especies en pollos.

TABLA 3

Muestras de *Eimeria* obtenidas de granjas avícolas australianas. La composición de las especies se determinó por análisis DPGE de productos de ITS-2 marcados con fluorescencia (véase la Figura 8)

Muestra	Especies Detectadas
X1	<i>E. acervulina</i> , <i>E. praecox</i>
X2	<i>E. mitis</i> , <i>E. praecox</i>
Muestra	Especies Detectadas
X4	<i>E. praecox</i>
X5	<i>E. mitis</i>
X7	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. mitis</i> , <i>E. praecox</i> , <i>E. tenella</i>
X8	<i>E. acervulina</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. mitis</i>
X9	<i>E. acervulina</i> , <i>E. mitis</i> , <i>E. praecox</i>
X10	<i>E. praecox</i>
X11	<i>E. acervulina</i> , <i>E. mitis</i>
X13	<i>E. praecox</i>
X14	<i>E. acervulina</i> , <i>E. praecox</i>
X15	<i>E. acervulina</i> , <i>E. brunetti</i> , <i>E. maxima</i> , <i>E. mitis</i> , <i>E. praecox</i>
X16	<i>E. praecox</i>

Ventajas y aplicabilidad industrial

Es evidente por la descripción efectuada en esta memoria que el ensayo de la presente invención tiene una serie de ventajas sobre las técnicas anteriormente conocidas y utilizadas para identificar las especies de *Eimeria*. Por ejemplo, el presente ensayo no exige el uso de conjuntos múltiples de iniciadores, específicos para cada una de las especies de *Eimeria* que se quisiera detectar, sino que podría utilizarse en su lugar un único conjunto de iniciador específico del género. Como resultado, múltiples especies podrían ser co-amplificadas a partir de una única muestra de ensayo, y ejecutarse en una sola línea de un gel electroforético apropiado.

Los sistemas de gel electroforético (SSCP y/o DPGE) usados en la invención para visualizar los productos de la amplificación, e identificar así las especies presentes en una muestra, son sumamente sensibles y tienen la capacidad para distinguir especies que podrían diferir en longitud en un único nucleótido, o por variaciones menores de la secuencia.

La técnica de detección electroforética basada en fluorescencia que aquí se describe tiene igualmente importantes ventajas, comparada con las técnicas anteriores utilizadas para identificar especies de *Eimeria*, particularmente en combinación con los nuevos iniciadores de la presente invención. El uso de dicho sistema de detección elimina la necesidad de utilizar nucleótidos radiactivos, por lo que es más seguro para el operador que debe realizarlo. Por otra parte, la lectura de los geles electroforéticos se realiza automáticamente con el uso de un sistema de imágenes por ordenador, que elimina la necesidad de manipulación y exposición de los mismos, y reduce notablemente el tiempo. Por otra parte, los cromatogramas que representan diferentes muestras (ejecutadas en distintos geles y días) pueden registrarse y almacenarse electrónicamente así como recuperarse en cualquier momento para análisis comparativo. En consecuencia, este enfoque electroforético automatizado es eficaz en cuanto al tiempo y al coste, es perfectamente apropiado para la tipificación de grandes números de muestras de oocistos y puede proporcionar una útil herramienta epidemiológica para estudios de prevalencia, así como para el control de los brotes epidémicos de coccidiosis.

Además, la invención aquí descrita ofrece ventajas significativas respecto al sistema RAPD-PCR (*Johnston et al*, 1995; *Greif et al*, 1996; *Shirley et al*, 1994 (*Parasitol Res*); *Shirley et al*, 1994 (*Res Vet Sci*)), puesto que emplea iniciadores perfectamente definidos para una región específica del rDNA para PCR con una exactitud relativamente elevada, manteniendo de ese modo al mínimo los problemas de la amplificación del DNA contaminante del huésped, y con una notable reproductibilidad como consecuencia de la no especificidad de los iniciadores y la baja temperatura de recocido en la PCR (*Elisworth et al*, 1993; *MacPherson et al*, 1993). En conjunto, las características novedosas arriba mencionadas permiten un despistaje rápido, de alta resolución y cualitativo de un gran número de muestras para cualquier especie del género *Eimeria*. Además, la invención elimina la necesidad de efectuar un análisis de secuencia del DNA (en primera instancia), lo que reduce el tiempo, la mano de obra y el coste.

La presente invención puede utilizarse, experimentalmente o a escala comercial, como medio para el diagnóstico de rutina y el control de la coccidia, particularmente la coccidia aviaria. Como alternativa, la invención podría aplicarse al control de calidad del estado de las especies de líneas monoespecíficas de laboratorio de *Eimeria*. Podría ser igualmente útil como herramienta complementaria para el desarrollo de futuras vacunas comerciales y ensayos diagnósticos.

Dentro de las especies de *Eimeria* existe una variación de la secuencia del DNA intraespecífica e interespecífica. Como resultado, las técnicas anteriores utilizadas para detectar las especies de *Eimeria* han evitado el uso de cualquier PCR que no sea específico de cada especie, a fin de eliminar la necesidad del necesario y amplio secuenciamiento y caracterización de los productos resultantes de la PCR a fin de identificar los aislados, al menos a nivel de especies. Por el contrario, un aspecto de la presente invención utiliza PCRs específicos del género que se dirige específicamente a la variación de las secuencias tanto dentro de las especies de *Eimeria* como entre ellas. Esta técnica ha resultado sorprendentemente ser muy ventajosa.

La invención se ha descrito aquí, con referencia a ciertas realizaciones preferidas, a fin de permitir al lector llevar a la práctica la invención sin un exceso de experimentación. No obstante, cualquier persona con un conocimiento normal de la técnica reconocerá fácilmente que muchos de los componentes y parámetros podrían ser variados o modificados hasta un cierto punto sin apartarse por ello del ámbito de la invención. Además, los títulos, los encabezamientos o similares se proporcionan para mejorar la comprensión de este documento por parte del lector, y no deben interpretarse como una limitación del ámbito de la misma.

La referencia a cualquier técnica anterior en la presente memoria no es, ni debe ser interpretada como tal, un reconocimiento ni forma alguna de sugerencia de que la técnica anterior forme parte del conocimiento general común en el campo que nos ocupa.

Bibliografía

- Andrews**, R. H. and **Chilton**, N. B., *Int. J. Parasitol* 1999, 29, 213-253.
- Barta**, J. R., **Martin**, D. S., **Liberator**, P. A., **Dashkevicz**, M., **Anderson**, J. W., **Felghner**, S. D., **Elbrecht**, A., **Perkins Barrow**, A., **Jenkins**, M. C., **Danforth**, H.D., **Ruff**, M. D. and **Profous-Juchelka**, H., *J. Parasitol.* 1997, 83, 262-271.
- Barta**, J. R., **Coles**, B. A., **Schito**, M. L., **Fernando**, M. A., **Martin**, A. and **Danforth**, H. D., *Int. J. Parasitol* 1998, 28, 485-492.
- Eckert**, J., **Taylor**, M., **Catchpole**, J., **Licois**, D., **Coudert**, P. and **Bucklar**, H., in: **Eckert**, J., **Braun**, R., **Shirley**, M. W. and **Coudert**, P. (Eds.), *Guidelines on techniques in coccidiosis research, Comisión Europea*, Luxemburgo 1995, pp. 103-119.
- Ellsworth**, D. L., **Rittenhouse**, K. D. and **Honeycutt**, R. L., *Biotechniques* 1993,14, 214-217. **Gasser**, A. B., **Eckert**, J. and **Rohrer**, L., *Parasitol Res.* 1987, 74,103-111.
- Gasser**, R. B., *Int. J. Parasitol.* 1997, 27, 1449-1463.
- Greif**, G., **Stephan**, B. and **Haberkorn**, A., *Parasitol. Res.* 1996, 82, 706-714.

ES 2 266 167 T3

- Johnston, D. A. and Fernando, M. A.**, *Parasitol. Res.* 1995, 81, 91-97.
- Johnston, D. A. and Fernando, M. A.**, *Parasitol. Res.* 1997, 83, 464-470.
- 5 **MacPherson, J. M., Eckstein, P. E., Scoles, G. J. and Gajadhar, A. A.**, *Mol. Cell Probes* 1993, 7, 293-299.
- McDougald, L. R. and Reid, W. M.**, in: **Calnek, B. W., Barnes, H. J., Beard, C. W., McDougald, L. R. and M., S. Y.** (Eds.), *Diseases of Poultry*, 10th Edition, Iowa State University Press, Ames, Iowa 1997, pp. 865-883.
- 10 **Molloy, J. B., Eaves, F. W., Jeston, P. J., Minchin, C. M., Stewart, N. P., Lew, A. E. and Jorgensen, W. K.**, *Avian Dis.* 1998, 42, 119-123.
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K**, *Genomics*, 1989, 5, 874-879.
- 15 **Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T**, *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2^a ed, Cold Spring Harbour Press, 1989.
- Schntzler, B. E., Thebo, P. L., Mattsson, J. G., Tomley, F. M. and Shirley, M. W.**, *Avian Pathol.* 1998, 27,490-497.
- 20 **Schnitzler, G. E., Thebo, P. L., Tomley, F. M., Uggla, A. and Shirley, M. W.**, *Avian Pathol.* 1999, 28, 89-93.
- Shirley, M. W. And Bumstead, N.**, *Parasitol. Res.* 1994, 80, 346-351.
- 25 **Shirley, M. W.**, *Res. Vet. Sci.* 1994, 57, 10-14.
- Shirley, M. W.**, in: **Eckert, J., Braun, A., Shirley, M. W. and Coudert, P.** (Eds.), *Guidelines on techniques in coccidiosis research* (Directrices sobre las técnicas en la investigación de la coccidiosis), Comisión Europea, Luxemburgo 1995, pp. 1-24.
- 30 **Stucki, U., Braun, A. and Roditi, I.**, *Exp. Parasitol.* 1993, 76, 68-75.
- Zhu, X. Q. and Gasser, A. B.**, *Electrophoresis* 1998, 19, 1366-1373.
- 35 **Woods, W. G., G. Richards, K. G. Whithear, G. R. Anderson, W. K. Jorgensen, and R. B. Gasser.** 2000. High-resolution electrophoretic procedures for the identification of five *Eimeria* species from chickens and detection of population variation. *Electrophoresis*: in press. (Procedimientos electroforéticos de alta resolución para la identificación de cinco especies de *Eimeria* de pollos y detección de la variación en la población. Electroforesis: en prensa).
- 40 **Woods, W. G., K. G. Whithear, D. G. Richards, G. R. Anderson, W. K. Jorgensen, and R. B. Gasser.** 2000. Single-strand restriction fragment length polymorphism analysis of the second internal transcribed spacer (ribosomal DNA) for six species of *Eimeria* from chickens in Australia. (Análisis del polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción de una sola cadena del segundo separador interno transcrito (DNA ribosómico) de seis especies de *Eimeria* de Australia). *Int. J. Parasitol.* 30:1019-1023.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Oligonucleótido que comprende al menos 15 bases consecutivas de la secuencia de DNA (ADN) designada SEQ ID N°: 25, o un recocido equivalente de la misma, **caracterizado** porque dicho oligonucleótido es capaz de hibridización específica en condiciones de PCR a una secuencia-blanco que es complementaria al menos a dichas 15 bases consecutivas, estando dicho oligonucleótido adaptado para iniciar la extensión del DNA durante la PCR.
- 10 2. Oligonucleótido según la reivindicación 1, que comprende la secuencia designada SEQ ID N°: 25.
- 10 3. Secuencia de oligonucleótido según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el oligonucleótido se elige entre el grupo formado por SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 11, SEQ ID N°: 13; y SEQ ID N°: 15.
- 15 4. Oligonucleótido que comprende al menos 15 bases consecutivas de secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 26, o un recocido equivalente de la misma, **caracterizado** porque dicho oligonucleótido es capaz de hibridización específica en condiciones de PCR a una secuencia-blanco que es complementaria al menos a dichas 15 bases consecutivas, y porque dicho oligonucleótido está adaptado para iniciar la extensión del DNA durante la PCR.
- 20 5. Oligonucleótido según la reivindicación 4, que comprende la secuencia designada SEQ ID N°: 26.
- 20 6. Secuencia de oligonucleótido según la reivindicación 1, **caracterizada** porque el oligonucleótido se elige entre el grupo formado por SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 12, SEQ ID N°: 14; y SEQ ID N°: 16.
- 25 7. Oligonucleótido que comprende al menos 15 bases de secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 27, o un recocido equivalente de la misma, **caracterizado** porque dicho oligonucleótido es capaz de hibridización específica en condiciones de PCR a una secuencia-blanco que es complementaria al menos a dichas 15 bases consecutivas, y porque dicho oligonucleótido está adaptado para iniciar la extensión del DNA durante la PCR.
- 30 8. Oligonucleótido según la reivindicación 7, que comprende la secuencia designada SEQ ID N°: 27.
- 30 9. Secuencia de oligonucleótido según la reivindicación 7, **caracterizada** porque el oligonucleótido se elige entre el grupo formado por SEQ ID N°: 17; SEQ ID N°: 19, SEQ ID N°: 21; y SEQ ID N°: 23.
- 35 10. Oligonucleótido que comprende al menos 15 bases consecutivas de secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 28, o un recocido equivalente de la misma, **caracterizado** porque dicho oligonucleótido es capaz de hibridización específica en condiciones de PCR a una secuencia-blanco que es complementaria al menos a dichas 15 bases consecutivas, y porque dicho oligonucleótido está adaptado para iniciar la extensión del DNA durante la PCR.
- 40 11. Oligonucleótido según la reivindicación 10, que comprende la secuencia designada SEQ ID N°: 28.
- 40 12. Secuencia de oligonucleótido según la reivindicación 10, **caracterizada** porque el oligonucleótido se elige entre el grupo formado por SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20, SEQ ID N°: 22; y SEQ ID N°: 24.
- 45 13. Par de iniciadores de PCR, comprendiendo un iniciador al menos 15 bases consecutivas de la secuencia DNA designada SEQ ID N°: 25, o un recocido equivalente de la misma, y un segundo iniciador que comprende al menos 15 bases consecutivas de la secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 26, o un recocido equivalente de la misma.
- 50 14. Par de iniciadores de la PCR según la reivindicación 13, **caracterizado** porque dicho par de iniciadores de la PCR comprende un iniciador que incluye una secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 25, y un segundo iniciador comprende la secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 26.
- 55 15. Par de iniciadores de la PCR según la reivindicación 13, **caracterizado** porque dicho par comprende una de las secuencias SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 13; o SEQ ID N°: 15; y una de las secuencias SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 14; o SEQ ID N°: 16.
- 60 16. Par de iniciadores de la PCR, comprendiendo un iniciador al menos 15 bases consecutivas de la secuencia DNA designada SEQ ID N°: 27, o un recocido equivalente de la misma, y un segundo iniciador que comprende al menos 15 bases consecutivas de la secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 28, o un recocido equivalente de la misma.
- 60 17. Par de iniciadores de la PCR según la reivindicación 16, **caracterizado** porque dicho par de iniciadores de la PCR comprende un iniciador que incluye la secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 27; y un iniciador que comprende la secuencia de DNA designada SEQ ID N°: 28.
- 65 18. Par de iniciadores de la PCR según la reivindicación 16, **caracterizado** porque dicho par de iniciadores de la PCR comprende una de las secuencias SEQ ID N°: 17; SEQ ID N°: 19; SEQ ID N°: 21; o SEQ ID N°: 23; y una de las secuencias SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20; SEQ ID N°: 22; o SEQ ID N°: 24.

ES 2 266 167 T3

19. Procedimiento para identificar la *Eimeria* en una muestra, comprendiendo dicho procedimiento los pasos de:

- proporcionar una muestra que comprende el DNA modelo genómico que debe ensayarse;
- proporcionar el DNA genómico de uno o más patrones de identidad conocida;
- proporcionar un par de iniciadores de la PCR seleccionado entre el grupo formado por
 - (i) iniciadores que comprenden al menos 15 bases consecutivas de las secuencias de DNA designadas SEQ ID N°: 25 y SEQ ID N°: 26, o los equivalentes recocidos de la misma; o
 - (ii) iniciadores que comprenden al menos 15 bases consecutivas de las secuencias de DNA designadas SEQ ID N°: 27 y SEQ ID N°: 28, o los recocidos equivalentes de las mismas;
- amplificar por medio de la PCR una región del DNA modelo usando dicho par de iniciadores para producir uno o más productos de la PCR de dicha muestra, y los citados uno o más patrones de identidad conocida;
- comparar el producto o productos de la PCR derivados de dicha muestra contra uno o más productos de la PCR de dicho patrón o patrones estándar de identidad conocida; e
- identificar las especies de *Eimeria* presentes dentro de la muestra.

20. Procedimiento según la reivindicación 19, **caracterizado** porque dicho par de iniciadores de la PCR comprende los iniciadores que incluyen las secuencias designadas SEQ ID N°: 25 y SEQ ID N°: 26.

21. Procedimiento según la reivindicación 19, **caracterizado** porque dicho par de iniciadores de la PCR comprende una de las secuencias SEQ ID N°: 9; SEQ ID N°: 11; SEQ ID N°: 13; o SEQ ID N°: 15; y una de las secuencias SEQ ID N°: 10; SEQ ID N°: 12; SEQ ID N°: 14; o SEQ ID N°: 16.

22. Procedimiento según la reivindicación 19, **caracterizado** porque dicho par de iniciadores de la PCR comprende los iniciadores que incluyen las secuencias designadas SEQ ID N°: 27 y SEQ ID N°: 28.

23. Procedimiento según la reivindicación 19, **caracterizado** porque dicho par de iniciadores de la PCR comprende una de las secuencias SEQ ID N°: 17; SEQ ID N°: 19; SEQ ID N°: 21; o SEQ ID N°: 23; y una de las secuencias SEQ ID N°: 18; SEQ ID N°: 20; SEQ ID N°: 22; o SEQ ID N°: 24.

24. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 **caracterizado** porque se ejecutan dos PCRs por muestra que debe ensayarse, y porque cada PCR utiliza un par diferente de iniciadores.

25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 23 **caracterizado** porque se ejecutan dos PCRs por muestra que debe ensayarse, y porque ambos pares de iniciadores se proporcionan dentro de dicha única PCR.

26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 25, **caracterizado** porque el producto o productos de la PCR derivados de dicha muestra se comparan contra el producto o productos de la PCR del patrón o patrones de identidad conocida por medio de electroforesis en gel.

27. Procedimiento según la reivindicación 26, **caracterizado** porque la electroforesis en gel es la DPGE.

28. Procedimiento según la reivindicación 26, **caracterizado** porque la electroforesis en gel es la SSCP.

29. Procedimiento según la reivindicación 26, **caracterizado** porque se emplean tanto la DPGE como la SSCP.

30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 26 y de la 29, **caracterizado** porque la electroforesis en gel se realiza en un sistema automatizado.

31. Uso de cualquiera de los oligonucleótidos definidos en las reivindicaciones 1 a 12, o los equivalentes de recocidos de los mismos, para la identificación de especies de *Eimeria*.

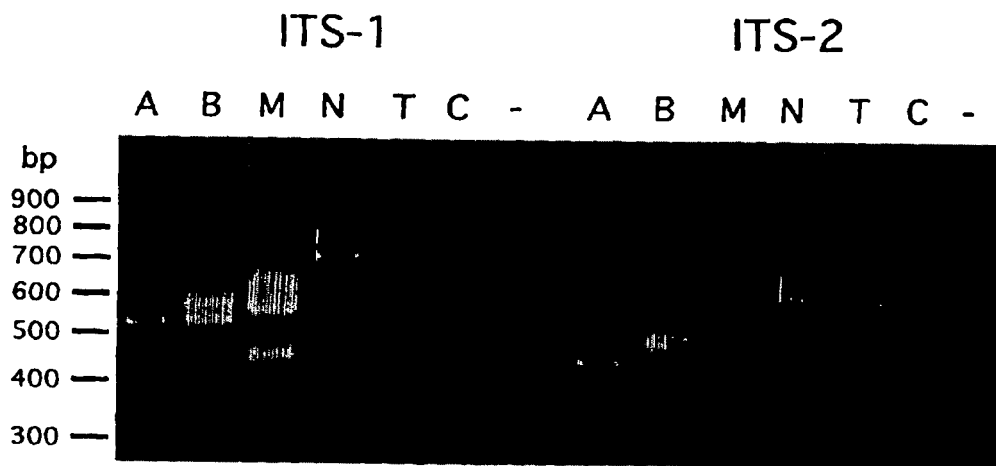
Fig.1

HW1-TC TAAAGGATGCAAAGTCGTAACACGGTTTCGGTAGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACACAAATTCGCACGCCCT
GGAAAGCCGCTGCTGGTMTTACAGGTTTCBAGCAATTCGCTTTTCCTGGGTGGCCAGCAGCAGGTAGTCCCTGGGTGTTGTTG
GAAAGAAAACCTTAGTCCATGCAACCCTTGAATCTGTTTTTCCTCTGCAACGGTTTTTCTACTTTTTAAAATTAAGGA
ATTTTTAGCTGCTGCAAGGATAATATGCCAGTAGTATGTACGTGGGGATGGGGGGTGGTGGCCATGCACGGGCTCC
GTEGGGCTTGTCGGTGCAGCCCCAGCCGCGCCGGCCAGCCCGTGATCGTGGATCGCCACGTACGTGGAGGGATTAT
GAGAGGAGAGAGACGCCCAAGGGCTGTGTGGTATGCAGAGCCCTTCGGCTCGGGCGATTTGTTCCGTGTGTGTGCTCTG
CTGCAATGCTGGTGTGTGCTTCTGCTCTCTCTCTCCGTTACATGCTGCTTGGAACTTTTGCTTCAGTAAGAAACCTTT
GCTCACTAAGGTGAATCGAATCACTTTTGTTCATGAGCAGAAAGCAATAGGTAGAATCGSAAAAAC-HW1R

Fig.2

HW2-CTTAAACAACCTACTACTAGTAGGCCATGCTGCTGCTCTCTCTGTCCTGTCCTGAGGTACTGTGAGGTTAGGCCATGCT
GCCGACAGAAAGTGAATGCTTTTCTGCTGTTCTGTTTTGTTGTTGCTGCTGATTTTTTCGGTCAACCBAAGGGGAGGTAGAAGCAT
GTHTGGTTTCATTTAGAGTGTGTTGCAATGGTTTTGAAGGAGATGCGGGTCTCTGAAATTTGTTGTCGGCAGCCGTGCTG
TGATGCTCCACAGATGCGGTTTTCCATGCCGTGCTTTCTATAGTGTGTTGTTATGCTTCTTCAATGGAAAGAGAGAG
ATPACGGTGGTGTATTTTTATGCAACGTGTTTTGCTCTGTTCTGGACGAATGTTTTGAGCAGGCTAGGGCGAGGTATAATA
GTGCAATGGGTATCCGACAACTGAAACCAATATAGTACAGGGCAACCATGCACTGCTGCTGCTGTTTTTTTTGGTA
TTACACATGTATGTATAGACTGAAATCAGT-HW2R

Fig.3



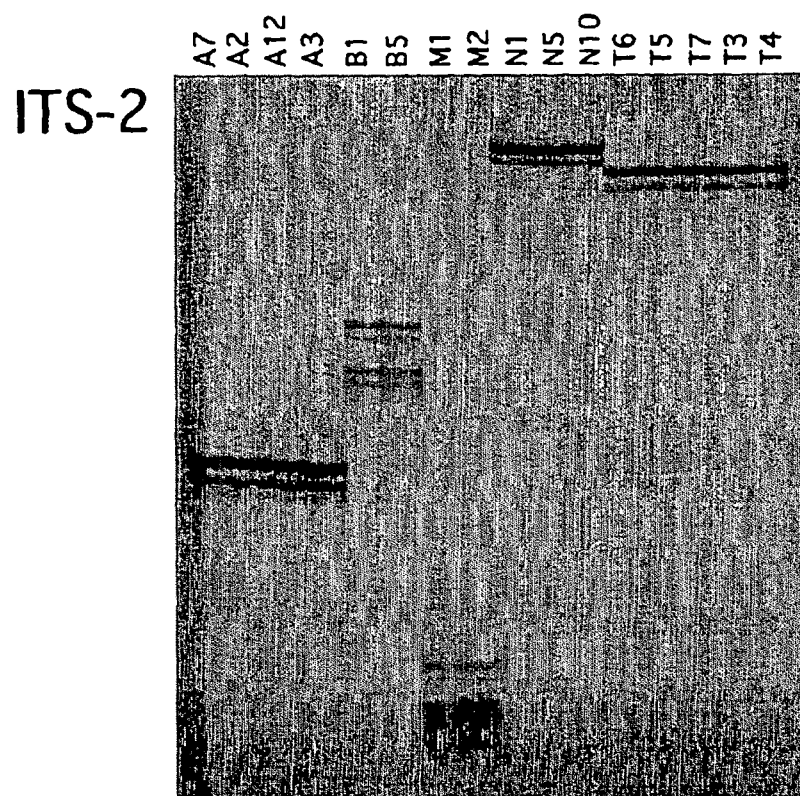
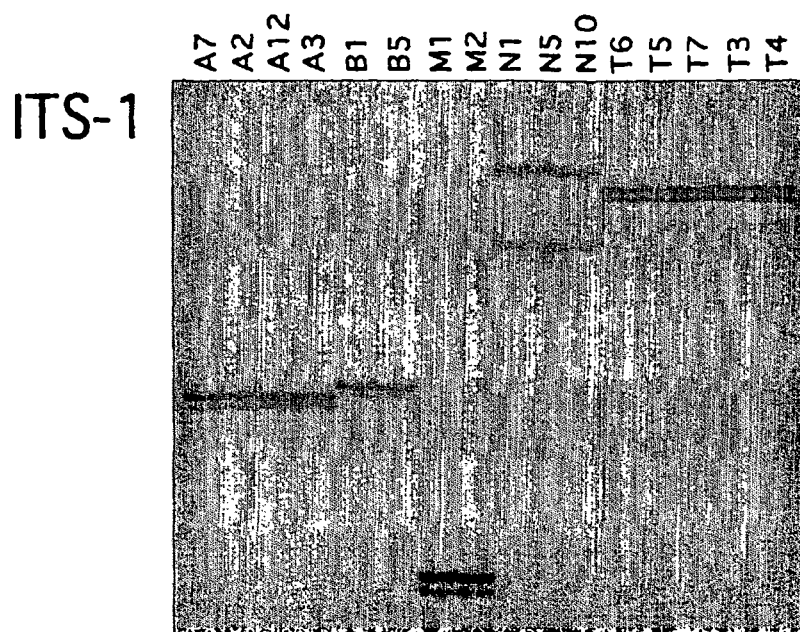


Fig.4

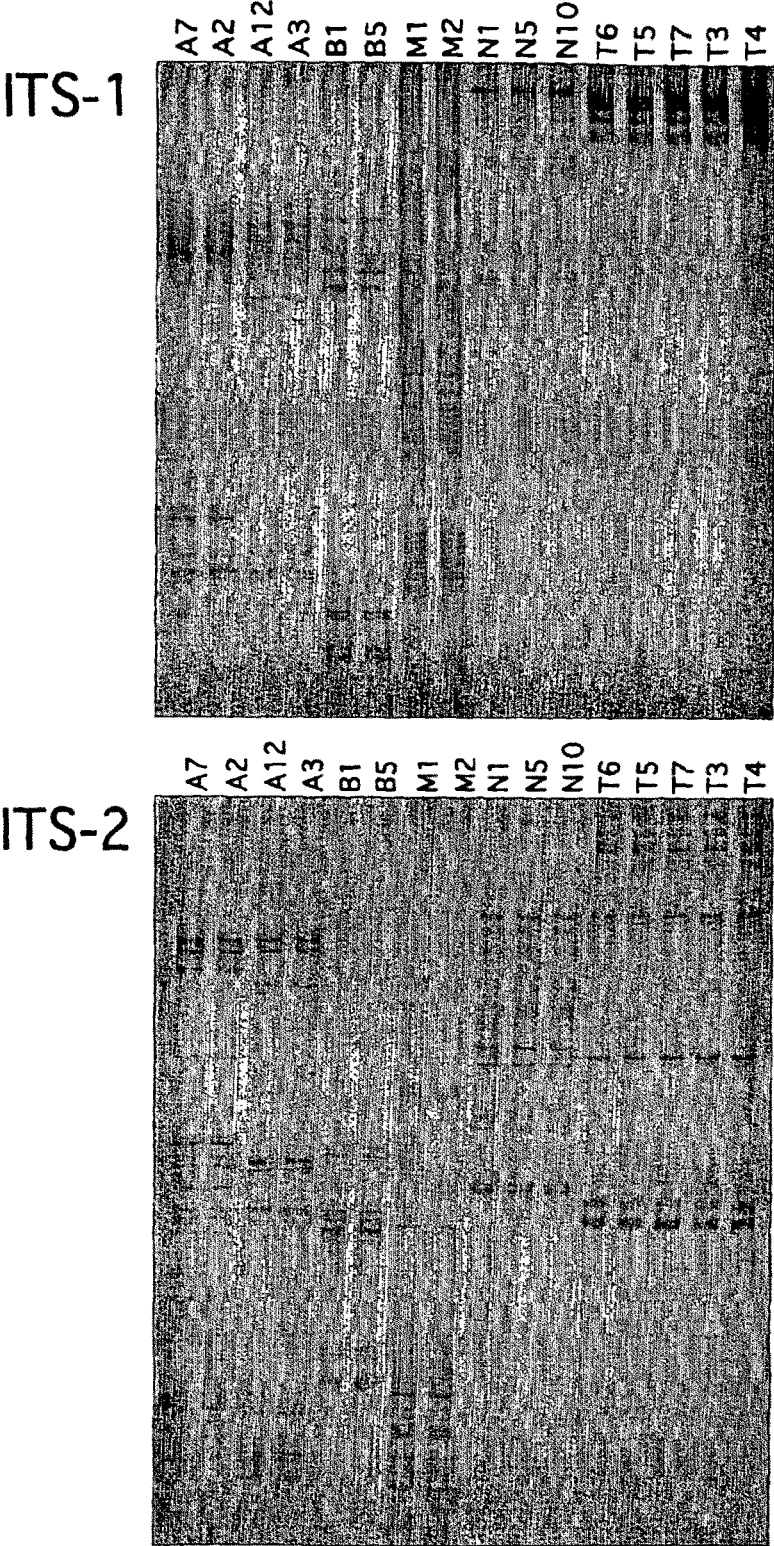


Fig.5

Fig.6

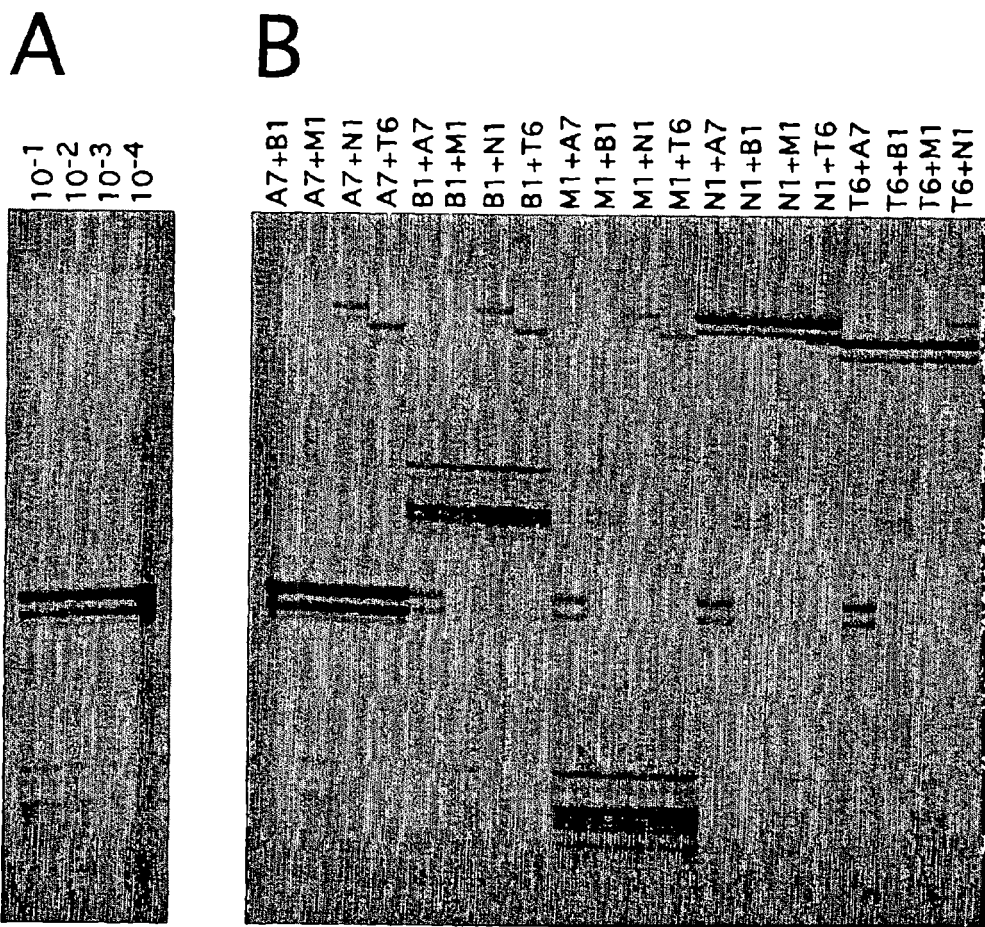


Fig.7

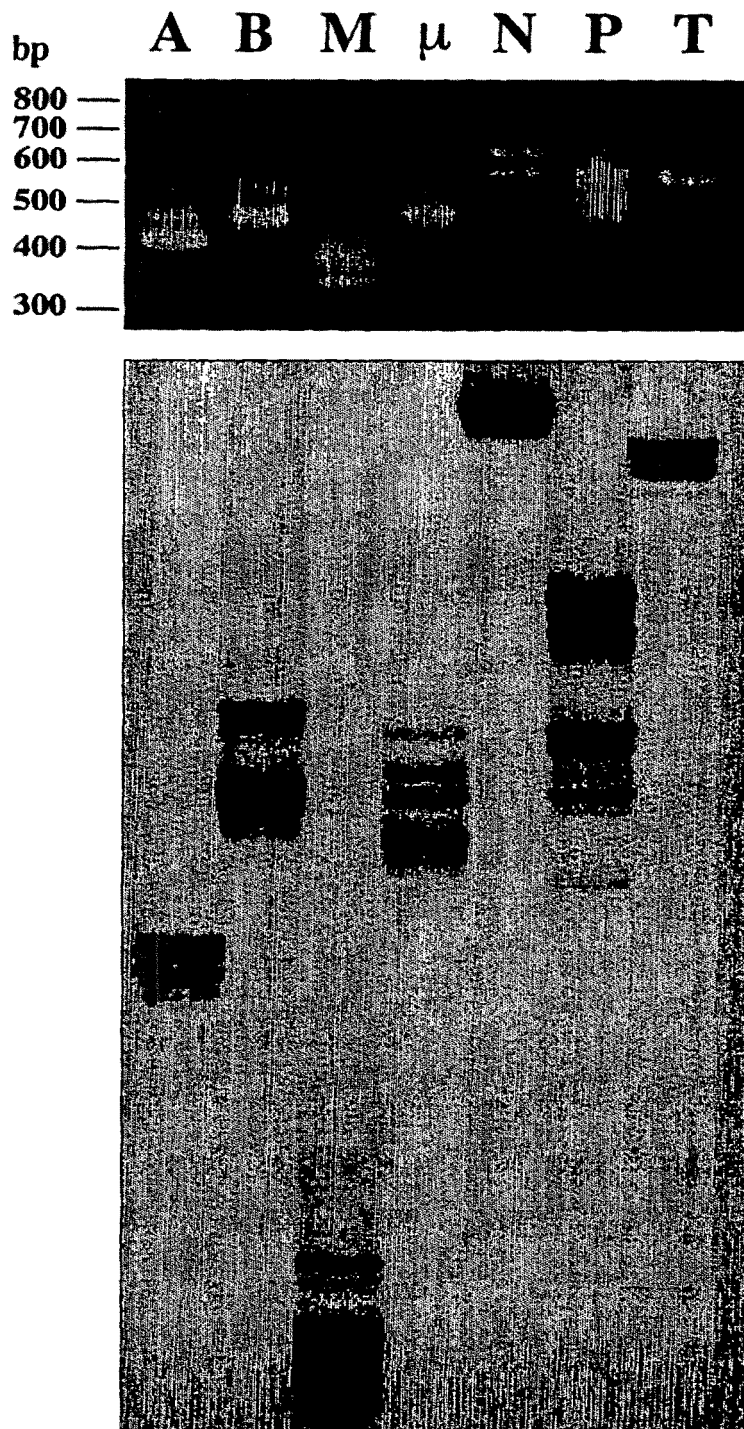
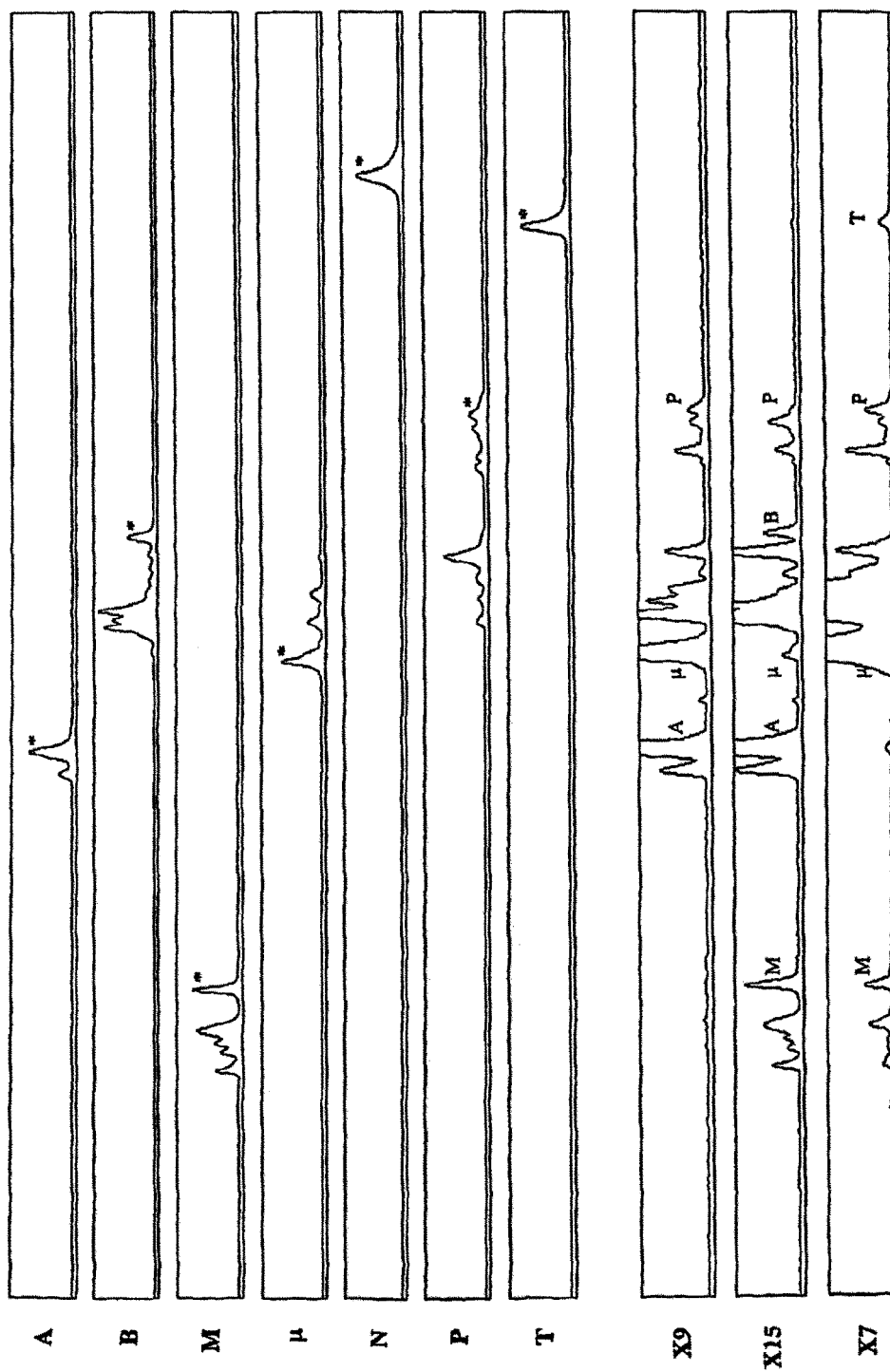
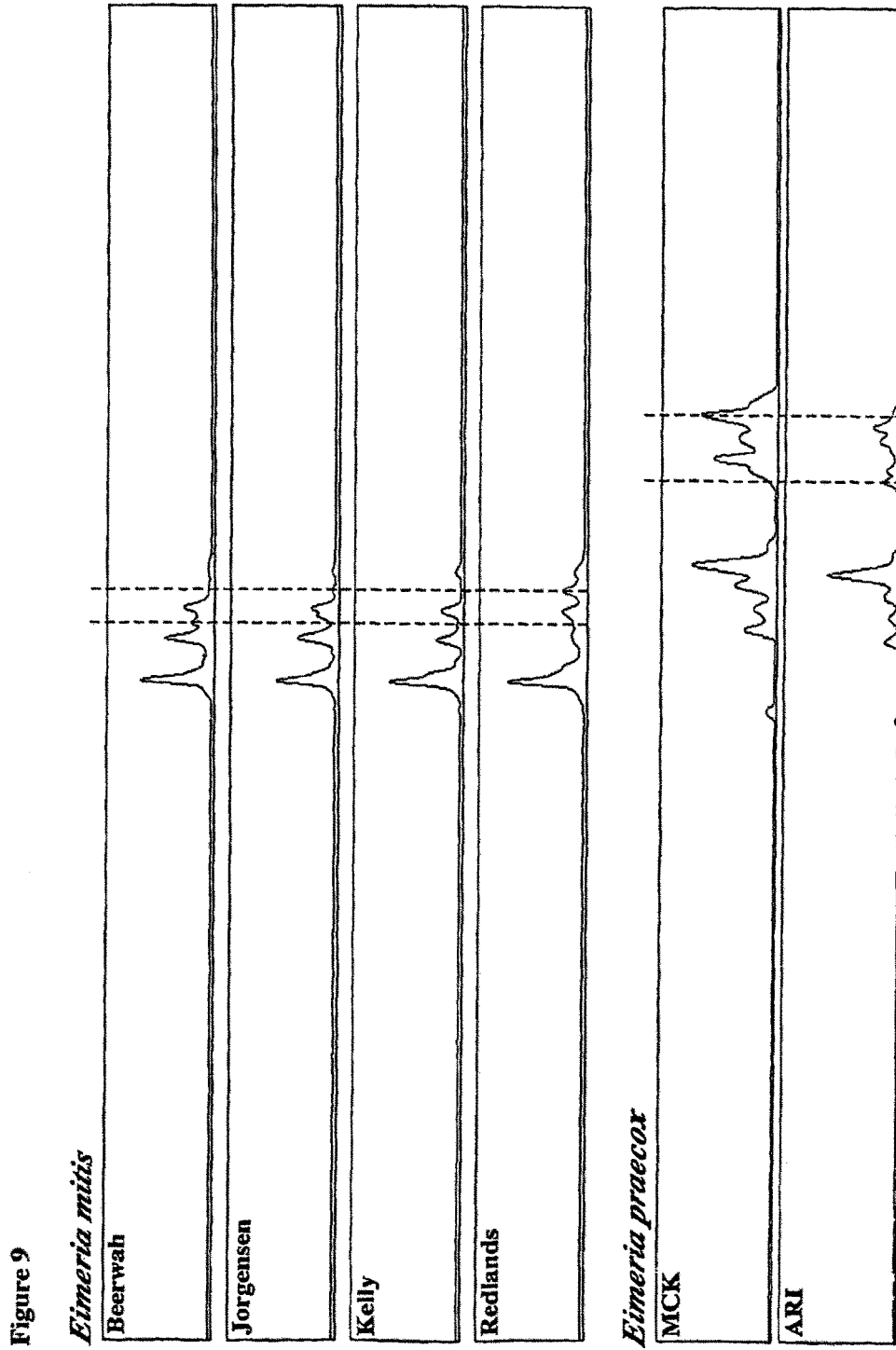


Fig.8





ES 2 266 167 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> GASSER, Robin B.
WOODS, Wayne G.
5 RICHARDS, David G.
WHITHEAR, Kevin G.
LA UNIVERSIDAD DE MELBOURNE

10 <120> IDENTIFICACIÓN BASADA EN PCR DE ESPECIES Y CEPAS DE *EIMERIA*

<130> 7464793/PAS/SAR

15 <140>

<141>

<160> 30

20 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

25 <211> 626

<212> DNA

<213> *Eimeria tenella*

30 <400> 1

	tctaaaggat	gcaaaagtcg	taacacggtt	tccgtagtga	acctgcggaa	ggatoattca	60
	cacaattcgc	acgcctggaa	cgcgctgctg	gttttacagg	tttcaagcat	tcgctttgcc	120
35	tgggtggcca	gcagcaggta	gtcgtcggtg	ttgttgaaa	gaaaacttta	gtccatcgca	180
	acccttgaat	ctgttttct	ctgcaacggt	tttctacttt	ttaaaaatt	gaaggaattt	240
	tttgctgctg	caaggatata	tcgcagtagt	atgtacgtgg	gcgatcgggg	gggtggtggc	300
40	gcatgcacgg	gctcgcgtgg	ggcctgctcg	tggcagcccc	agcgcgccgg	cgcagccccg	360
	tgatcgtcga	tcgcgcacgt	acgtggaggg	gattatgaga	ggagaagacg	cgcacggggc	420
45	tgtgtcgtat	gcagagcgct	cgcggtcgg	gcgattgttc	cgtgttgtgt	gctctgctgc	480
	atgctgggtg	gtgctgtctg	tctctctctc	tctccgttac	atgctgcttg	gaactttgct	540
	tcagcaagaa	accttgctc	actaagggtga	atcgaatcac	tttgttgat	gagcagaagg	600
50	aagaataggt	agaaatcgga	aaaaac				626

<210> 2

55 <211> 512

<212> DNA

<213> *Eimeria tenella*

60

65

ES 2 266 167 T3

<400> 2

5	cttaacaact	cctactagta	ggccatgctg	ctgtctgtct	ctgttccttg	tggtcctgtg	60
	agggttcggc	gatgctgccg	acagaagtga	gtgcttgct	cgtttctgtt	ttgtgctcgg	120
	gaatttttc	gggtcaccaa	aggggaggta	gaagcatggt	tggttcatt	tgagtgcgt	180
10	tgattgggt	ttgaaggaga	tgcgcgctct	ctcgaaattg	ttgtcggcag	cggtgctgtg	240
	tgtctgcaca	gtgtgccgtt	ttccatgcct	gtgcttcta	tagtgcgctc	gtatgctcct	300
	ttcattcgga	aagagagaga	tacggtggtt	gtatttatg	caacgttggt	tgtctcgttc	360
15	tggacgaatg	tttgagcag	ggctagggcg	aggtataata	gtgcatgggt	atgcgacaac	420
	gtgaaacgac	atatagtaca	cggcaccatg	gacgtgttc	atgcgtcgtt	tttttcggt	480
20	attacacatg	tatgtataga	cctgaaatca	gt			512

<210> 3

25 <211> 10
 <212> DNA
 <213> construcción sintética

30 <400> 3

tctaaaggat 10

35 <210> 4

<211> 4
 <212> DNA
 <213> construcción sintética

40 <400> 4

cagc 4

45 <210> 5

<211> 5
 <212> DNA
 50 <213> construcción sintética

<400> 5

55 gtttt 5

<210> 6

<211> 10
 60 <212> DNA
 <213> construcción sintética

<400> 6

65 atgcgtgagc 10

ES 2 266 167 T3

	<210> 7	
	<211> 10	
	<212> DNA	
5	<213> construcción sintética	
	<400> 7	
	actgattca	10
10		
	<210> 8	
	<211> 10	
	<212> DNA	
15	<213> construcción sintética	
	<400> 8	
20	tgatatgctt	10
	<210> 9	
	<211> 19	
25	<212> DNA	
	<213> construcción sintética	
	<400> 9	
30	agttgcgtaa atagagccc	19
	<210> 10	
35	<211> 19	
	<212> DNA	
	<213> construcción sintética	
40	<400> 10	
	aagacatcca ttgctgaaa	19
	<210> 11	
45	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> construcción sintética	
50	<400> 11	
	aagttgcgta aaagagcc	18
55		
	<210> 12	
	<211> 19	
	<212> DNA	
60	<213> construcción sintética	
	<400> 12	
65	caagacatcc attgctgaa	19

ES 2 266 167 T3

	<code><210> 13</code>		
	<code><211> 18</code>		
	<code><212> DNA</code>		
5	<code><213> construcción sintética</code>		
	<code><400> 13</code>		
10	<code>aagttgcgta aatagagc</code>		18
	<code><210> 14</code>		
	<code><211> 18</code>		
15	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> construcción sintética</code>		
	<code><400> 14</code>		
20	<code>caagacatcc attgctga</code>		18
	<code><210> 15</code>		
25	<code><211> 17</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> construcción sintética</code>		
30	<code><400> 15</code>		
	<code>ttgcgtaaata agagccc</code>		17
35	<code><210> 16</code>		
	<code><211> 17</code>		
	<code><212> DNA</code>		
40	<code><213> construcción sintética</code>		
	<code><400> 16</code>		
45	<code>gacatccatt gctgaaa</code>		17
	<code><210> 17</code>		
	<code><211> 17</code>		
50	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> construcción sintética</code>		
	<code><400> 17</code>		
55	<code>egtctgttcc agtgtct</code>		17
	<code><210> 18</code>		
60	<code><211> 19</code>		
	<code><212> DNA</code>		
	<code><213> construcción sintética</code>		
65	<code><400> 18</code>		
	<code>aattcagcgg gtaacctcg</code>		19

ES 2 266 167 T3

	<210> 19		
	<211> 17		
	<212> DNA		
5	<213> construcción sintética		
	<400> 19		
10	acgtctgttt cagtgtc		17
	<210> 20		
	<211> 19		
15	<212> DNA		
	<213> construcción sintética		
	<400> 20		
20	aaattcagcg ggtaacctc		19
	<210> 21		
25	<211> 17		
	<212> DNA		
	<213> construcción sintética		
30	<400> 21		
	acgtctgttt cagtgtc		17
35	<210> 22		
	<211> 18		
	<212> DNA		
40	<213> construcción sintética		
	<400> 22		
45	aaattcagcg ggtaacct		18
	<210> 23		
	<211> 16		
50	<212> DNA		
	<213> construcción sintética		
	<400> 23		
55	gtctgtttca gtgtct		16
	<210> 24		
60	<211> 17		
	<212> DNA		
	<213> construcción sintética		
65	<400> 24		
	ttcagcgggt aacctcg		17

ES 2 266 167 T3

	<p><210> 25</p>		
	<p><211> 20</p>		
	<p><212> DNA</p>		
5	<p><213> construcción sintética</p>		
	<p><400> 25</p>		
10	<p>aagttgcgta aatagagccc</p>		20
	<p><210> 26</p>		
	<p><211> 20</p>		
15	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> construcción sintética</p>		
	<p><400> 26</p>		
20	<p>caagacatcc attgctgaaa</p>		20
	<p><210> 27</p>		
25	<p><211> 18</p>		
	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> construcción sintética</p>		
30	<p><400> 27</p>		
	<p>acgtctgttt cagtgtct</p>		18
35	<p><210> 28</p>		
	<p><211> 20</p>		
	<p><212> DNA</p>		
40	<p><213> construcción sintética</p>		
	<p><400> 28</p>		
45	<p>aaattcagcg ggtaacctcg</p>		20
	<p><210> 29</p>		
	<p><211> 19</p>		
50	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> construcción sintética</p>		
	<p><400> 29</p>		
55	<p>acctggttga tcctgccag</p>		19
	<p><210> 30</p>		
60	<p><211> 21</p>		
	<p><212> DNA</p>		
	<p><213> construcción sintética</p>		
65	<p><400> 30</p>		
	<p>cttccgcagg ttcacctacg g</p>		21