



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 N.º de publicación: **ES 2 072 825**

21 Número de solicitud: 9302656

51 Int. Cl.⁶: G01N 33/569
G01N 33/542

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **21.12.93**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.95**

Fecha de concesión: **15.01.96**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **01.03.96**

45 Fecha de publicación del folleto de patente:
01.03.96

73 Titular/es:
**Instituto Nacional de Investigación y
Tecnología Agraria y Alimentaria
Jose Abascal, 56
28003 Madrid, ES**

72 Inventor/es: **García Fernández, Pedro;
Viseras Alarcón, Javier y
Adroher Aurroux, Javier**

74 Agente: **González Vacas, Eleuterio**

54 Título: **Kits de diagnóstico inmunológico por inmunofluorescencia indirecta de la Theileriosis bovina.**

57 Resumen:
Kits de diagnóstico inmunológico por inmunofluorescencia indirecta de la Theileriosis bovina.
El kit de diagnóstico inmunológico por inmunofluorescencia indirecta (I.F.I.) de la Theileriosis bovina comprende básicamente a) al menos, un porta de inmunofluorescencia que contiene fijado el antígeno (Cepa Algar); y b) sueros bovinos controles (positivo y negativo). El antígeno se ha obtenido a partir de un cultivo celular de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de T. Annulata Cepa Algar, procedente de un aislamiento de campo de un caso clínico de theileriosis localizado en el Suroeste de la Península Ibérica. Se describe además la técnica de I.F.I. (F.A.O., 1988), adaptada por nosotros para el uso del kit de diagnóstico inmunológico de la Theileriosis Mediterránea en España.
Este kit tiene aplicación en Veterinaria y es adecuado para el diagnóstico específico de la Theileriosis Mediterránea bovina producida por T. annulata.

ES 2 072 825 B1

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

DESCRIPCION

Kits de diagnóstico inmunológico por inmunofluorescencia indirecta de la Theileriosis bovina.

Campo de la invención

Esta invención se refiere a un nuevo kit de diagnóstico inmunológico, por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI), de la Theileriosis bovina.

Antecedentes de la invención

Bajo el término genérico de Piroplasmosis se incluyen dos tipos de enfermedades parasitarias de animales domésticos, concretamente las Babesiosis, producidas por las especies de *Babesia* y las Theileriosis, producidas por las del género *Theileria*.

La Theileriosis Mediterránea es una enfermedad del ganado vacuno transmitida por garrapatas del género *Hyalomma*, cuyo agente causal es el protozoo hemático *Theileria annulata*. Clínicamente se caracteriza por un período de incubación, desde la picadura de la garrapata, de unos 15 ó 20 días, al término de los cuales las reses presentan la tríada sintomatológica de fiebre elevada, anemia e ictericia. Las formas eritrocíticas de *T. Annulata* son de pequeño tamaño (0,5-1,5 μ), pleomórficas, predominando las formas anulares en número de 1 a 5 por hematie.

Este parásito es tisular y se localiza preferentemente en los órganos del Sistema Fagocítico Mononuclear (S.F.M.) en donde son muy abundantes las formas de división esquizogónica denominadas esquizontes o Cuerpos Azules de Koch. El proceso parasitario afecta a los principales órganos vitales (hígado, riñón y carozón) y de defensa inmunitaria (ganglios linfáticos, bazo), lo que ocasiona la muerte del animal y presenta una mortalidad media de un 20% de las reses enfermas.

La Theileriosis Mediterránea se distribuye por la Europa meridional, Asia y Africa del Norte, siendo más frecuente en los países de la Cuenca del Mediterráneo (España, Portugal, Marruecos, Argelia y Túnez), Próximo Oriente (Egipto e Israel) y Medio y Extremo Oriente (India, Pakistán y Japón). En la Península Ibérica se presenta de manera enzoótica en todo el sur occidental: Andalucía occidental, sur de Extremadura y Comarca del Alentejo portugués, presentando focos esporádicos en otras zonas tales como Andalucía oriental, Meseta Central (Sierra del Guadarrama) y Castilla-León (provincia de Salamanca).

Basándose en estudios epizootiológicos propios^{3,4,5}, se puede afirmar que la importancia de la Theileriosis Mediterránea en Andalucía se manifiesta. En una encuesta realizada sobre unos 500 animales sacrificados en matadero, se encontró una frecuencia de parasitación a *Theileria* del 18%. Especial incidencia se encontró en la raza de lidia, en donde el 72,7% de las ganaderías eran positivas a *T. annulata*⁶. Esta evidencia nos lleva a concluir la importancia del toro de lidia en la presencia de la Theileriosis y el papel que juega como reservorio de la enfermedad.

En el Sur de la Península Ibérica existen zonas enzoóticas a la Theileriosis Mediterránea en donde la incidencia es muy alta, tales como las comarcas ganaderas de las provincias de Cádiz, Huelva, Sevilla y la Comarca del Alentejo por-

tugués^{7,12}. Asimismo, existen otras zonas vecinas a éstas, en donde la Theileriosis no es frecuente, pero donde se presentan algunos focos esporádicos (provincias de Córdoba, Málaga y Granada) así como también se presenta, de manera esporádica, en provincias más al norte (Cáceres, Salamanca y Madrid)^{9,13,1}.

Considerando la incidencia de la Theileriosis por razas zootécnicas y tipo de explotación, según estimaciones propias, se pueden diferenciar dos problemáticas distintas: por una parte, el ganado extensivo de razas autóctonas criado en dehesas, tales como la retinta y el ganado de lidia, y por otra, el ganado de producción cárnica y lechera de régimen intensivo. En el primer caso, la incidencia de los parásitos en sangre es muy elevada, pero se traduce en una escasa sintomatología clínica debido a la inmunidad natural que los animales adquieren por la abundancia de las garrapatas vectoras en estas zonas enzoóticas. Por el contrario, en cebaderos y explotaciones lecheras de las zonas enzoóticas es en donde se produce el mayor número de muertes, debido a una inmunidad natural más escasa. El mayor número de bajas se presenta preferentemente en los ejemplares importados de razas selectas de producción cárnica (charolais, limousine, etc...) y lechera (frisona holandesa), y en aquellas reses que proceden de otras comarcas. Esto es motivado en gran parte, por la ausencia de una inmunidad adquirida frente a la Theileriosis en general o a una cepa de *Theileria* en particular. Esta circunstancia puede constituir un obstáculo en la selección y mejora genética del ganado vacuno en las comarcas de interés ganadero enzoóticas de Piroplasmosis.

El diagnóstico de esta parasitosis en España, se realiza, usualmente, mediante observación clínica de la res enferma por el facultativo, quien diagnostica Piroplasmosis o "Fiebre de la garrapata", basándose fundamentalmente en la sintomatología, estacionalidad y ocurrencia de estas parasitosis. Este tipo de diagnóstico carece de toda especificidad, ya que con la misma sintomatología existen otras patologías. El término Piroplasmosis incluye enfermedades tales como las Babesiosis y la Theileriosis, así como la Anaplasmosis que es una rickettsiosis con síntomas muy semejantes a las anteriores.

El diagnóstico más usual de laboratorio es la observación microscópica de los merozoitos en frotis de sangre teñidos con Giemsa o bien el detectar la presencia de esquizontes en improntas de bazo o hígado de un animal muerto. Para el buen desarrollo de estas técnicas se necesita un cierto grado de especialización del analista, quien se ve ante la duda de distinguir unos parásitos hemáticos de muy pequeño tamaño (merozoitos de 0-5-3 μ). De todas formas, con este método tan sólo se puede llegar a diferenciar el género (*Babesia*, *Theileria* o *Anaplasma*), pero nunca se puede llegar a obtener una exacta determinación específica. Si se tiene en cuenta el grado de especialización requerido y el tiempo dedicado en su realización, aunque los reactivos utilizados no sean muy caros, lo que se obtiene en realidad es un diagnóstico grosero y a la larga, caro.

En otros países se han desarrollado técnicas

inmunológicas para el diagnóstico de estas parasitosis utilizándose la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) para el diagnóstico de la Theileriosis Africana o Fiebre de la Costa Este (E.C.F.)¹⁰. Para la detección de *T. annulata* se han empleado igualmente la técnica de I.F.I.¹¹ y ELISA⁸. La especificidad antigénica de las distintas cepas geográficas de este parásito, hacen que el uso de estas técnicas requieran antígenos autóctonos, generalmente no comercializados, para que el diagnóstico sea fiable.

Por consiguiente, existía la necesidad de disponer del antígeno autóctono español de forma que se pudiera preparar un sistema para el diagnóstico inmunológico de esta enfermedad del ganado vacuno en España. Para ello se procedió a aislar, por primera vez en España, y a mantener en cultivo celular de linfoblastos bovinos, una cepa local de *T. annulata*, con la que se pudiese obtener el antígeno necesario para el montaje del diagnóstico inmunológico de esta parasitosis en nuestro país¹⁴.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un kit para el diagnóstico inmunológico de la Theileriosis bovina Mediterránea por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) utilizando un antígeno procedente de la cepa "Algar", cepa autóctona de *T. annulata* aislada en el sur occidental de la Península Ibérica (Cádiz, España).

El kit de diagnóstico comprende básicamente:

- al menos, un porta de inmunofluorescencia que contiene fijado el antígeno (Cepa Algar);
- suero bovino control positivo;
- suero bovino control negativo.

Los procedimientos de preparación de los reactivos necesarios para la utilización del kit, así como la técnica IFI seguida, están basados fundamentalmente en los trabajos descritos por la F.A.O. (1988), que sigue la técnica de PIPANO y CAHANA (1969) adaptada por nosotros como sigue:

Como porta puede utilizarse cualquier porta de los habitualmente utilizados en el desarrollo de técnicas de Inmunofluorescencia que contenga un número adecuado de pocillos al objeto de depositar el antígeno, los controles y los sueros problemas a analizar en las diluciones apropiadas. El número de pocillos puede variar en un amplio margen aunque por razones prácticas resulta aconsejable el empleo de portas que contengan 18 pocillos aunque portas con mayor o menor número de pocillos pueden igualmente ser utilizados.

El antígeno se puede obtener a partir de un cultivo celular de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata* cepa "Algar". El antígeno se puede fijar al porta mediante el empleo de acetona. El porta, tras la fijación del antígeno se mantiene a -20°C hasta su empleo.

Como suero bovino control positivo frente a *T. annulata* se utilizan sueros procedentes de animales infectados experimentalmente con la Cepa

Algar y aunque una vez testados frente a nuestro antígeno dan un nivel de títulos de anticuerpos suficientemente altos (superior a 320).

Para la producción seriada de estos sueros controles se puede hacer un pase de la cepa Algar, mantenida en cultivo in vitro y utilizada como antígeno, por inoculación subcutánea en becerros de 6-18 meses de edad, de 10⁷ linfoblastos infectados con esquizontes resuspendidos en 1-2 ml. de medio RPMI. La producción de un nuevo acceso de la enfermedad y la obtención de nuevos esquizontes de la cepa Algar en estos animales por punción ganglionar y posterior establecimiento de la cepa en una nueva línea celular por cultivo in vitro y la inoculación de esta última línea celular a otro animal sano nos proporciona el citado suero control positivo. Con este procedimiento se aminoran las fluorescencias inespecíficas propias de la célula hospedadora (linfoblasto) y se gana en especificidad frente a los antígenos propios del esquizonte.

Como suero control negativo se utiliza preferentemente suero de becerros de 6 a 18 meses de edad que han sido testados como animales sanos mediante las pruebas de saneamiento ganadero y que una vez analizado mediante la técnica IFI frente a *T. annulata* dió resultado negativo.

Adicional y opcionalmente, el kit de diagnóstico puede contener:

- un conjugado fluorescente;
- el tampón necesario para proporcionar el pH adecuado y para preparar las diluciones apropiadas de las muestras y de los controles; y
- Azul de Evans como tinción de contraste al objeto de facilitar la evaluación al microscopio de las muestras.

Como conjugado fluorescente puede emplearse cualquiera de los habitualmente utilizados en este tipo de técnicas, tales como la inmunoglobulina G anti-inmunoglobulina G bovina, marcada con fluoresceína o cualquier otro compuesto capaz de producir fluorescencia frente a una fuente de luz ultravioleta.

Como tampón debe utilizarse tampón fosfato salino (PBS) de pH 7,2.

El método para el diagnóstico inmunológico de la Theileriosis Mediterránea bovina por la Técnica de IFI, está descrito por PIPANO y CAHANA (1969) y recopilado por la F.A.O. (1988). En esta técnica la que se utiliza, adaptada por nosotros, en parte, y utilizada con el kit de diagnóstico que describimos (ver Ejemplo 3).

Los sueros de los animales infectados por *T. annulata*, que contienen anticuerpos contra el antígeno fijado en el porta, en las diluciones adecuadas, así como los sueros controles positivos, dan una reacción coloreada fluorescente que se puede detectar en el microscopio de fluorescencia. Por el contrario, los sueros control negativos, así como los sueros procedentes de animales no infectados con *T. annulata* no dan dicha reacción coloreada.

Se considera reacción positiva cuando el título de anticuerpos es igual o mayor a la dilución 1/40.

Mediante la aplicación del método y kit de diagnóstico inmunológico previamente citados es posible diagnosticar específicamente el agente causal de la Theileriosis bovina mediterránea en España, lo que permite discernir esta parasitosis de otras que presentan muy parecida sintomatología.

Los resultados obtenidos por nuestro laboratorio con la utilización de un antígeno autóctono (Cepa Algar) han sido contrastados con un antígeno de referencia israelí, que amablemente nos ha sido enviado por el Dr. E. Pipano, Jefe de la División de Parasitología del Kimron Veterinary Institute de Israel.

Actualmente, en nuestro laboratorio se emplea rutinariamente el kit y el método de diagnóstico por IFI previamente citados para diagnosticar la infección causada por *T. annulata* con resultados óptimos y repetitivos, tanto en los estudios de campo de zonas endémicas de Andalucía, como en los de infección experimental que nuestro laboratorio ha realizado.

Ejemplo 1

Preparación del antígeno y de los sueros controles 1.A. *Obtención del antígeno*

Para la obtención del antígeno se mantiene un cultivo celular de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata* cepa "Algar". El medio de cultivo se prepara con medio RPMI-1640 con 25 mM de Hepes, suplementado con un 20% (v/v) de suero bovino fetal inactivado. A este medio se le adicionan una combinación de penicilina G sódica (100 U.I/ml), sulfato de estreptomycin (100 µg/ml) y sulfato de kanamicina (100 mg/ml). Los cultivos se mantienen a 37°C en un incubador de CO₂, en una atmósfera con 5% de CO₂ en aire. El medio se renueva cada tres días.

1.B. *Preparación del antígeno*

Partiendo de un frasco de cultivo, se decanta el sobrenadante y se lava la monocapa celular con 5 a 10 ml de PBS. Por decantación se retira el PBS y se añade 1 ml de solución de citrato (citrato sódico 0,44% y cloruro potásico 0,99% en agua bidestilada) durante 5 minutos para los frascos de cultivo celular de 25 cm³ y se deja en reposo durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se dispersan las células por agitación y se lavan dos veces con 10 ml de PBS por centrifugación a 1500 r.p.m. durante 10 minutos. El botón celular se resuspende en 10 ml de formol al 0,5% y se deja a temperatura ambiente durante 30 minutos. A continuación se centrifuga la suspensión y se decanta el sobrenadante. El sedimento se lava dos veces con PBS y a continuación se resuspende en PBS y se hace un conteo celular en una cámara Neubauer. La suspensión celular se ajusta a 5x10⁵ células/ml mediante adición de PBS.

Con esta suspensión celular se preparan los portas de inmunofluorescencia (porta-antígeno) añadiendo a cada pocillo del porta 0,01 ml de antígeno, se dejan secar a temperatura ambiente, se fijan con acetona y se conservan a 20°C hasta su utilización.

1.C. *Obtención de los sueros controles*

Para la obtención de sueros controles positivos

frente a *T. annulata* se necesitan becerros infectados de 6 a 18 meses que, preferentemente, han sufrido un acceso agudo de Theileriosis. Para ello, se mantienen animales infectados por pases sucesivos mediante inoculación de sangre parasitada o mediante la inyección de un homogeneizado de glándulas salivares de *Hyalomma lusitanicum* infectadas con esporozoitos de *T. annulata* o mediante inoculación de cultivos secundarios de la cepa aislados en otro becerro.

Para los sueros controles negativos, se utiliza suero bovino de becerros de 6 a 18 meses que han sido testados como animales sanos mediante las pruebas de saneamiento ganadero y que no han tenido contacto previo con el parásito. Preferentemente deben ser de zona no endémica.

Ejemplo 2

Preparación de un kit de diagnóstico inmunológico

Se prepara un kit de diagnóstico inmunológico por IFI de la Theileriosis Mediterránea bovina que comprende:

- cinco portas de inmunofluorescencia de 18 pocillos cada uno que contiene 0,01 ml de antígeno (Cepa Algar), obtenido según el Ejemplo 1, en cada pocillo;
- 2 ml de suero bovino control positivo, obtenido según Ejemplo 1; y
- 2 ml de suero bovino control negativo, obtenido según Ejemplo 1.

Adicionalmente, el kit puede incorporar un conjugado fluorescente indicando su concentración de uso. Azul de Evans y tampón para las diluciones.

Ejemplo 3

Método para el diagnóstico inmunológico, por IFI, de la Theileriosis Mediterránea bovina (Protocolo de realización)

Se sigue la metodología descrita por la F.A.O. (1988), adaptada en parte por nosotros.

1. Fijar el antígeno (Cepa Algar) a cada uno de los pocillos del porta de inmunofluorescencia con acetona en un baño durante 10 minutos.
2. Dejar secar al aire.
3. Hacer dobles diluciones de los sueros problemas con PBS de pH 7,2, así como de los sueros controles (positivos y negativos).
4. Colocar las diluciones de los sueros problemas de manera progresiva y creciente en los pocillos del porta, reservando la primera fila de pocillos para los sueros controles.
5. Incubar el porta en cámara húmeda a 37°C durante 30 minutos.
6. Realizar tres lavados con PBS pH 7,2 de cinco minutos cada uno a temperatura ambiente.
7. Dejar secar los portas al aire con ayuda de un ventilador.

8. Colocar en cada pocillo una gota de conjugado fluorescente (inmunoglobulina G anti inmunoglobulina G bovina, marcadas con fluoresceína), previamente diluido a 1/100 en PBS pH 7.2. Opcionalmente se puede preparar el conjugado fluorescente en la dilución 1/100 con Azul de Evans al 1/10.000 en PBS como tinción de contraste.
9. Colocar el porta en incubación en cámara húmeda y oscuridad a 37°C durante 30 minutos.
10. Realizar tres lavados con PBS pH 7,2 de cinco minutos cada uno a temperatura ambiente.
11. Secar el portaobjetos al aire.
12. Montar el porta con glicerina tamponada y colocar un cubre objetos.
13. Observar con microscopio de fluorescencia con el objetivo de 40 aumentos en cuarto oscuro.

Resultados:

- Los sueros de los animales infectados por *T. annulata* así como los sueros controles positivos, dan una reacción coloreada intensa que se puede detectar en el microscopio de fluorescencia por la observación de los esquizontes dentro de los linfoblastos parasitados con un color verde fluorescente. Nosotros consideramos como reacción positiva la dilución 1/40 ó mayor que indica que una res está o ha estado parasitada por *T. annulata*.
- Por el contrario, los sueros control negativos, así como los sueros procedentes de animales no infectados con *T. annulata* no dan dicha reacción coloreada.

No se considera necesario hacer más extensa esta descripción para que cualquier experto en la materia comprenda el alcance de la invención y las ventajas que de la misma se derivan.

Los términos en que se ha redactado esta memoria deberán ser tomados siempre en sentido amplio y no limitativo.

Referencias bibliográficas

- 1.- BRANDAU C.; MONGE A.; FERMIN, M^a L.; JIMENEZ MAZZUCHELLI, F; TESOURO, M.A.: "Tratamiento de la Theileriosis bovina con parvacuona y buparvacuona; control y seguimiento "The Veterinary Record, Junio 1989, 279-281.
- 2.- F.A.O.: "Control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten". Volumen II. Roma, 1988, 458 pp.

3.- GARCIA FERNANDEZ, P.: "Contribución al estudio de las pioplasmosis bovinas en el Sur de España". Tesis Doctoral. Universidad de Granada, 1978. 591 pp.

4.- GARCIA FERNANDEZ, P.; ROMERO RODRIGUEZ, J.; HUELI, L.E.: "Piroplasmosis bovinas en Andalucía I. Estudio en reses procedentes de mataderos". Rev. Ibérica Parasitol. 45, 1985, 49-58.

5.- GARCIA FERNANDEZ, P; ROMERO RODRIGUEZ, J.; HUELI, L.E.: "Piroplasmosis bovinas en Andalucía II. Estudio de explotaciones agropecuarias". Rev. Ibérica Parasitol 47, 1987, 7-13.

6.- GARCIA FERNANDEZ, P y ROMERO RODRIGUEZ, J.: "Epizootiología de las piroplasmosis del toro de lidia". Proceed, II Conferencia Mediterránea de parasitología. Granada 1981. Res. n° 140.

7.- GARCIA FERNANDEZ, P.; HUELI, L.E.; VISERAS ALARCON, J.; LLAMAS TRUJILLO, R.; CARRASCO CARRILLO, L. y GASCA ARROYO, A.: "Distribución comarcal de las piroplasmosis del ganado en Andalucía". SIGET I, Zaragoza, 1991, pp. 40.

8.- GRAY, M.A.; LUCKINS, A.G.; RAE, P.F., and BROWN, C.G.D.: "Evaluation of an enzyme immunoassay for serodiagnosis of infections with *Theileria parva* and *T. annulata*". Res. Vet. Sci. 29, 1980, 360.366.

9.- HABELA, M.A.; SERRANO, F.J.; BREÑA, M.; NIETO, C.G.: "*Theileria annulata* (Dschunskowsky and Luhs, 1904): Seroprevalencia en el ganado bovino de actitud lechera del término de Casa (Cáceres)". Res. I. Congr. Internac. Asoc. Sudocc. Europ. Parasitol, (Valencia, España), 1991, pp. 277.

10.- KIMBER, C.D. and BURRIDGE, M.J.: "The indirect fluorescent antibody test for experimental E.C.F. (*Theileria parva*). Evaluation of dried blood samples as a source of antibody". Res. Vet. Science 13, 1972, 133-135.

11.- PIPANO E. and CAHANA M.: "Fluorescente antibody test for the serodiagnosis of *Theileria annulata*". J. Parasitol. 55, 1969, 765.

12.- SILVA LEITAO, J.L.: "Theileriose bovina em Portugal". Trabalhos Laboratorio Central de Patol. Veter. 3, 1945, 1-12.

13.- SIMON VICENTE, F.; RAMAJO MARTIN, V.; ENCINAS GRANDES, A.: "Theileriosis y Babesiosis bovinas y ovinas en la provincia de Salamanca". Rev. Ibérica Parasitol. Vol. extr. 1987, 31-37.

14.- VISERAS, J.; ADROHER F.J.; HUELI L.E. y GARCIA FERNANDEZ, P.: "Aislamiento y cultivo de una cepa de *Theileria annulata* Dschunkowsky & Luhs, 1904 procedente de la provincia de Cádiz (España)". Res. IX Reunión Cient. Asoc. Parasitol. Esp. pp. 30.

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un kit de diagnóstico inmunológico por Inmuno Fluorescencia Indirecta (IFI) de la Theileriosis bovina, **caracterizado** porque comprende:

- al menos, un porta de inmunofluorescencia que contiene fijado el antígeno (Cepa Algar);
- suero bovino control positivo; y
- suero bovino control negativo.

2. Kit según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el antígeno Cepa Algar se ha obtenido a partir de un cultivo celular de linfoblastos bovinos infectados con esquizontes de *T. annulata*

Cepa Algar procedente del suroeste de España.

3. Kit según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el suero control positivo frente a *T. annulata* se ha obtenido a partir de becerros infectados por pases sucesivos mediante inoculación de un cultivo estandarizado de *T. annulata* (cepa Algar), sangre parasitada o mediante la inyección de un homogeneizado de glándulas salivares de *Hyalomma lusitanicum* infectadas con esporozoitos de *T. annulata* (cepa Algar).

4. Kit según la reivindicación 1, **caracterizado** porque el suero control negativo se ha obtenido a partir de becerros que han sido testados como animales sanos mediante las pruebas de saneamiento ganadero y que no han tenido contacto previo con *T. annulata* y cuyo origen es de zona no endémica.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65



INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.⁶: G01N 33/569, 33/542

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	KIMBER et al. The indirect fluorescent antibody test for experimental east coast fever (<i>Theileria parva</i> infection of cattle). Evaluation of dried blood samples as a source of antibody. Res. Vet. Sci., 13, 1972, pág. 133-135	
A	PIPANO et al. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of <i>Theileria annulata</i> . J. Parasitol., 55, 1969, pág. 765	

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe
24.02.95

Examinador
J. López Nieto

Página
1/1