

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 374 313**

51 Int. Cl.:
G01N 33/72 (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07253688 .1**
96 Fecha de presentación: **18.09.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **1927859**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.06.2008**

54 Título: **ANTICUERPOS MONOCLONALES Y POLICLONALES HACIA ALBÚMINA Y HEMOGLOBINA EQUINAS Y APARATO Y MÉTODOS QUE USAN LOS ANTICUERPOS EN LA IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE ÚLCERAS Y OTRAS SANGRÍAS DEL TRACTO DIGESTIVO EN EQUINOS.**

30 Prioridad:
28.11.2006 US 563998

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
15.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
15.02.2012

73 Titular/es:
FREEDOM HEALTH, LLC
65 AURORA INDUSTRIAL PARKWAY
AURORA OH 44202-8088, US

72 Inventor/es:
Pellegrini, Franklin L. y
Carter, Scott D.

74 Agente: **de Elizaburu Márquez, Alberto**

ES 2 374 313 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

Anticuerpos monoclonales y policlonales hacia albúmina y hemoglobina equinas y aparato y métodos que usan los anticuerpos en la identificación y localización de úlceras y otras sangrías del tracto digestivo en equinos

ANTECEDENTES DEL INVENTO

5 Campo del Invento

La presente descripción se refiere, en general, a aparatos y métodos diagnósticos y de ensayo y, más particularmente, a anticuerpos hacia hemoglobina equina y albúmina equina y al uso de los mismos en aparatos, kits y métodos de ensayo para detectar y localizar úlceras gástricas y colónicas y otras sangrías del tracto digestivo en caballos.

10 Antes de discutir el ensayo y el diagnóstico de úlceras en caballos, es beneficioso discutir la anatomía algo única del tracto digestivo de los caballos que contribuye a la alta incidencia de úlceras de tracto digestivo en los caballos. En el caso de los seres humanos y la mayoría de los demás animales, se secreta ácido gástrico en el estómago en respuesta a la acción de comer. Por contraste, los caballos han evolucionado a lo largo de milenios como animales de alimentación por goteo (comiendo lentamente pero más o menos continuamente a lo largo de la mayor parte del día) y sus sistemas digestivos están adaptados para dicha dieta, con una producción continua de jugos gástricos y una secreción de bilis en el intestino anterior desde el hígado. De este modo, se puede pensar en el estómago de un caballo como una bomba de ácido que produce ácido gástrico más o menos continuamente durante todo el día, se esté alimentando o no el caballo.

20 Como consecuencia de su anatomía y las modernas prácticas de alimentación y cuidados, todos los caballos, y particularmente los caballos de altas cualidades, presentan una altísima incidencia de úlceras gástricas (estomacales). En los caballos de carreras, por ejemplo, se ha comunicado que tanto como el noventa y siete por ciento de la población de caballos de carreras tienen úlceras en el tracto digestivo, quedando sólo algo retrasado el porcentaje de caballos de exhibición que tienen úlceras en el tracto digestivo. Incluso los potros de los caballos de altas cualidades han resultado afectados por este estado, teniendo úlceras en el tracto digestivo aproximadamente el sesenta por ciento de los potros de los caballos de altas cualidades. Aunque los caballos de recreo presentan una menor incidencia de úlceras en el tracto digestivo que los caballos de exhibición, la creciente incidencia de úlceras en el tracto digestivo en los dos últimos decenios ha sido significativa en todos los segmentos de la población de caballos, incluyendo los caballos de recreo.

30 Aunque las incidencias de úlceras colónicas (úlceras en el ciego y/o colon del caballo) han quedado en gran medida sin explorar, también pueden representar un problema de salud diferente e igualmente grave para los caballos. Uno de los únicos estudios científicos hasta la fecha se centraba específicamente en la incidencia de úlceras colónicas y mostraba unos sorprendentes resultados. En este estudio, una muestra representativa aleatoria de caballos presentaba una incidencia de úlceras gástricas de aproximadamente cincuenta y cinco por ciento y una incidencia de úlceras colónicas de cuarenta por ciento. Las incidencias de úlceras gástricas y colónicas no eran idénticas, lo que significaba que algunos caballos sólo presentaban úlceras gástricas y otros caballos sólo presentaban úlceras colónicas. Sin embargo un gran porcentaje de los caballos que presentaban úlceras colónicas también presentaban úlceras gástricas, no teniendo úlceras gástricas ni colónicas menos del treinta por ciento de la población de caballos en su totalidad. Como se mencionó anteriormente, la incidencia de úlceras en el tracto digestivo de los caballos de exhibición y los caballos de carreras es incluso mayor que estas estadísticas para la población general de caballos.

40 Hay diversas soluciones para el problema de las úlceras de tracto digestivo en los caballos, que se han utilizado en la técnica. Dichas soluciones han incluido el uso de antiácidos para neutralizar temporalmente el ácido del estómago, el uso de fármacos para inhibir la producción de ácido gástrico, y el descanso prolongado y una dieta de forraje. Más recientemente, se ha desarrollado un complemento dietético nuevo y muy eficaz para tratar y/o prevenir las úlceras gástricas y las úlceras colónicas, como se describe en la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 10/435.367, presentada el 9 de mayo de 2003 y titulada "Dietary Supplement and Method for the Treatment and Prevention of Digestive Tract Ulcers in Equines and Other Animals", solicitud de patente que es cedida al cesionario del presente invento.

50 Aunque dichos tratamientos están disponibles, ha seguido siendo muy difícil diagnosticar úlceras gástricas en caballos con un alto grado de precisión, y no ha sido posible en absoluto diagnosticar úlceras colónicas en los caballos. Se ha mostrado que el método más comúnmente utilizado para diagnosticar úlceras equinas, es decir, el uso de síntomas (que son signos inespecíficos frecuentemente vagos, tales como pérdida de peso, poco apetito, letargia y fiebre intermitente) combinado con los resultados percibidos del tratamiento, es casi completamente nada fiable. Esto se debe al hecho de que puede haber muchas posibles causas de los mismos síntomas, y no todos los caballos muestran los mismos síntomas de ulceración o ni siquiera muestran síntomas notables de ulceración. Como tal, el uso de esta técnica es a menudo poco mejor que un acertijo.

55 En el Documento WO2006/062800 se describe un aparato para el diagnóstico intestinal y un método relacionado para detectar y localizar úlceras gástricas y colónicas en caballos. En el ensayo se buscan anticuerpos hacia la hemoglobina y la hematina equinas, y se utilizan marcadores visuales en los kits de ensayo para significar la detec-

ción de cualquiera de estos componentes o de ambos.

El Documento US2006/0134707 es similar al WO2006/062800 anteriormente discutido, y de nuevo se utilizan anticuerpos hacia la globina y la hematina equinas en aparatos, kits y métodos de ensayo para detectar y localizar úlceras gástricas y colónicas en caballos.

- 5 En el Documento WO200/29852 se describe un método para detectar la presencia de un analito en una muestra biológica detectando globina o hemoglobina y utilizando esto para detectar sangrías gastrointestinales superiores e inferiores en caballos.

Zhang et al., "Early diagnosis for colorectal cancer in China", febrero de 2002, World Journal of Gastroenterology, volumen 8, nº 1, páginas 21-25, discuten estudios existentes sobre el diagnóstico precoz del cáncer colorrectal.

- 10 El único modo fiable de diagnosticar úlceras gástricas en caballos ha sido por medio del uso de un videoendoscopio de tres metros, el cual tiene las desventajas significativas de ser caro, llevar mucho tiempo y ser estresante (tanto para el caballo como para el entrenador/propietario). El coste de adquisición de un videoendoscopio de tres metros es bastante elevado y es prohibitivamente costoso para los propietarios y demás salvo para la minoría más selecta de entrenadores. Por encima del coste del endoscopio está el hecho de que el procedimiento es molesto y lleva
15 mucho tiempo. Los propietarios, entrenadores y veterinarios que no tienen un videoendoscopio de tres metros deben consultar a un médico o veterinario que tenga un endoscopio. Esto lleva tiempo adicional y es caro, es aún más estresante para el caballo y es frustrante ya que deja el cuidado del caballo fuera del alcance del propietario, el entrenador o el veterinario habitual.

- 20 Además, incluso si se dispone de un videoendoscopio de tres metros y se utiliza, los resultados están restringidos a lo que es visible mediante el dispositivo, es decir, a tejidos estomacales. Aunque dicho dispositivo es eficaz para ver y diagnosticar úlceras estomacales, el diagnóstico de ulceración en el restante noventa y cinco por ciento del tracto digestivo de un caballo es aún imposible con este dispositivo. El intestino posterior (aproximadamente veintitrés metros del intestino delgado, el ciego y el colon) no se puede ver utilizando un endoscopio ya que no se dispone de endoscopios de suficiente longitud y ya que el uso de un endoscopio requeriría vaciar suficientemente el intestino
25 posterior, lo que probablemente mataría al caballo. De hecho, sólo ha ocurrido recientemente que se haya documentado la elevada incidencia de úlceras colónicas en caballos, y eso se realizó únicamente por medio del uso de análisis visuales post mórtem.

- 30 En consecuencia, el objetivo primario de la presente descripción es presentar un kit de ensayo para úlceras equinas y sangrías del tracto digestivo y un método relacionado para el uso del kit de ensayo, que sean eficaces en el diagnóstico tanto de úlceras o sangrías gástricas como de úlceras o sangrías colónicas en caballos. Un objetivo relacionado es proporcionar una indicación muy específica en cuanto a la presencia de úlceras o sangrías gástricas o de úlceras o sangrías colónicas, o de ambas. Otro objetivo relacionado es que sea muy fiable tanto en la identificación de la existencia de úlceras o sangrías en un caballo como en cuanto a la identificación del(de los) tipo(s) de las úlceras que están presentes en el caballo, y que no produzca excesivas lecturas positivas falsas.

- 35 Otro objetivo es que el ensayo sea tanto simple como rápido de llevar a cabo y que no requiera ninguna experiencia ni entrenamiento especiales para que un usuario lleve el ensayo a cabo. Un objetivo más es que sea completamente autónomo, sin requerir un análisis de laboratorio ni un equipo de procesamiento adicional para que se pueda hacer funcionar en cualquier parte como un ensayo de campo. Aún otro objetivo es que proporcione rápidamente los resultados del ensayo, en minutos en lugar de requerir un tiempo prolongado.

- 40 El kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas debe ser también de una construcción que sea tanto duradera como resistente, y no se deberían requerir tampoco unas condiciones de almacenamiento especiales para los kits de ensayo con objeto de asegurar que tienen un prolongado tiempo de conservación. Con objeto de potenciar el interés comercial del kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas, también debería ser de una construcción barata para conseguir de este modo el mercado más amplio posible. Finalmente, también es un objetivo que se alcancen todas
45 las susodichas ventajas y objetivos del método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas sin incurrir en ninguna desventaja relativa sustancial.

SUMARIO DEL INVENTO

- 50 Las desventajas y limitaciones de la técnica fundamental anteriormente discutida son superadas por el presente invento como se expone en las reivindicaciones adjuntas. Con este invento, se proporcionan un kit de ensayo para úlceras equinas y sangrías del tracto digestivo y un método para preparar el kit de ensayo, que permiten proporcionar una identificación muy sensible y específica de la presencia de úlceras gástricas o colónicas, o de ambas, y de otras sangrías del tracto digestivo en caballos, distinguiendo claramente el método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas entre úlceras o sangrías gástricas y úlceras o sangrías colónicas. Al ensayo para úlceras o sangrías del presente invento se hace referencia como ensayo de sangre fecal ya que permite identificar componentes de
55 la sangre contenidos en las heces del caballo que se examina.

De acuerdo con las enseñanzas del presente invento, se han identificado dos componentes sanguíneos que son

respectivamente muy indicativos de la presencia de una úlcera o sangría gástrica y/o una úlcera o sangría colónica. Los inventores del presente invento han determinado que la presencia de albúmina equina intacta que esté contenida en las heces es muy probablemente de origen colónico. Esto se debe al hecho de que la albúmina sanguínea equina procedente de una úlcera gástrica (y cualquier otra sangre craneal al duodeno, para esa cuestión) resultaría degradada por ácidos y peptidasas en el estómago, lo que haría que la albúmina equina resultara indetectable en las heces. Sin embargo, la hemoglobina equina contenida en la sangre procedente de una úlcera o sangría gástrica sobrevivirá, al menos en parte, a los ácidos y peptidasas del estómago, lo que hará que sea detectable en las heces.

De este modo, la presencia de albúmina equina intacta en las heces es indicativa de la existencia de una úlcera o sangría colónica, mientras que la presencia de hemoglobina equina es indicativa de la existencia de una úlcera o sangría gástrica o una úlcera o sangría colónica, o de ambas, una úlcera o sangría gástrica y una úlcera o sangría colónica. Los expertos en la técnica apreciarán además que un método y un kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas en que se usen albúmina equina y hemoglobina equina como indicadores proporcionarán una buena indicación tanto de la presencia como de la localización de una o más úlceras o sangrías en el caballo. La forma preferida del método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas es un inmunoensayo que se diseña para detectar la presencia de los indicadores albúmina equina y hemoglobina equina, y, específicamente, el ensayo para úlceras o sangrías equinas de la realización preferida del presente invento es un ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA; del inglés, enzyme-linked immunosorbent assay), que es un método típicamente empleado en bioquímica para detectar si una sustancia particular está presente o no en una muestra.

Los ensayos ELISA son ensayos inmunoquímicos rápidos en que están implicados un anticuerpo o un antígeno (moléculas inmunológicas) y una enzima (una proteína que cataliza una reacción bioquímica). Se utiliza un ensayo ELISA para detectar una sustancia que tiene propiedades antigénicas, principalmente proteínas (a diferencia de pequeñas moléculas e iones, tales como glucosa y potasio), tales como anticuerpos, antígenos bacterianos y hormonas. El llamado ensayo ELISA "rápido" es un inmunoensayo de flujo lateral (LFI; del inglés, lateral flow immunoassay) que consiste en una membrana que tiene un paso de fluido desde un extremo de la misma, que está fijado a una fuente de fluido, hasta el otro extremo de la misma que está fijado a un sumidero de fluido, con tres zonas discretas y separadas a lo largo de la membrana.

La primera zona contiene un anticuerpo etiquetado, que es el anticuerpo fijado a un agente colorante tal como glóbulos de látex coloreados o un agente tintóreo u oro coloidal. Los anticuerpos etiquetados se mueven con el flujo de fluido desde la zona primera hacia las zonas segunda y tercera y finalmente hacia el sumidero de fluido. Si la sustancia de interés está en el fluido, se unirá a los anticuerpos etiquetados. La segunda zona, que es típicamente una línea que se extiende a través de la membrana, contiene anticuerpos que están fijados a la membrana.

Los anticuerpos de la zona segunda presentan afinidad por (y atraerán y se pegarán a) la sustancia de interés, creándose un "sándwich" con los anticuerpos etiquetados y la sustancia de interés que está unida a los anticuerpos de la zona segunda, creándose por ello una línea coloreada que es una lectura positiva que indica la presencia de la sustancia de interés. Cuanta más sustancia de interés esté contenida en el fluido, más anticuerpos etiquetados se unirán a la sustancia de interés unida a los anticuerpos de la zona segunda.

En la zona tercera, que también es típicamente una línea que se extiende a través de la membrana, se utiliza una reacción diferente de anticuerpo/antígeno que creará una línea coloreada si el flujo y el volumen son suficientes, independientemente de la presencia de la sustancia de interés. Esto actúa como un testigo para indicar que el sistema de ensayo está funcionando apropiadamente. La zona tercera está en la cara opuesta de la zona segunda a partir de la zona primera para indicar que el fluido que se está ensayando ha atravesado la zona segunda, indicando por ello que se ha suministrado al sistema de ensayo el suficiente fluido que se ensaya para que el sistema de ensayo funcione apropiadamente.

Dicho sistema de ensayo se ilustra genéricamente en la Patente de EE.UU. nº 5.602.040, concedida a May et al., que se basa en dos anticuerpos. Partículas que incluyen un primer grupo de anticuerpos son fijadas a la superficie de partículas de látex coloreado o de oro coloidal que han sido secadas sobre la membrana de nitrocelulosa en un primer extremo de la misma, y representan la zona primera a la que antes se hizo referencia. Un segundo grupo de anticuerpos están fijados a una membrana de nitrocelulosa en forma de una línea, y representan la zona segunda a la que antes se hizo referencia.

El ensayo se lleva a cabo haciendo que la membrana de nitrocelulosa absorba una muestra líquida por el primer extremo. Las partículas de la zona primera son liberadas por el flujo de líquido, y el analito que se va a detectar se une al anticuerpo presente sobre dichas partículas. En la zona segunda, el analito que se va a detectar se une también al otro anticuerpo que está presente en la línea, y se forma una línea coloreada visible que muestra la presencia de dicho analito. Este tipo de técnica inmunocromatográfica de ensayo se basa en el flujo a través de una membrana, y a ella se puede hacer referencia como "técnica de flujo lateral". En la Patente de EE.UU. nº 5.602.040, como en la Patente de EE.UU. nº 5.712.170, se hace referencia a Kouvonen et al., que proporcionan un excelente resumen de la técnica en este área.

5 Existe un segundo formato que se puede emplear, en el que se utiliza una técnica de "exclusión competitiva" para generar un resultado positivo o negativo. En lugar del ensayo de tipo sándwich anteriormente descrito, el antígeno purificado (albúmina equina o hemoglobina equina) está fijado a la tira, y el anticuerpo diana está contenido en la fase móvil. Cuando no hay antígeno diana presente en la muestra de ensayo, el anticuerpo es libre para moverse en la fase móvil y llegará a unirse al anticuerpo fijado presente sobre la tira, lo que dará lugar a una línea sobre la tira. En consecuencia, la presencia de una línea indica un resultado negativo.

10 Por otra parte, si el antígeno diana está presente en la muestra de ensayo, el antígeno se unirá entonces al anticuerpo de la fase móvil, haciendo que no esté disponible para unirse a la tira de ensayo, lo que dará lugar a que no aparezca una línea. En consecuencia, la ausencia de una línea en este ensayo indica un resultado positivo. Este tipo de técnica de ensayo por exclusión competitiva se describe y utiliza en el ensayo de fármacos fabricado por Varian, Inc., bajo el nombre comercial ONTRAK TESTCUP y vendido exclusivamente por Roche Diagnostics. Se describe en la Patente de EE.UU. nº 6.375.897, concedida a Bachand.

15 Los ensayos LFI son de fabricación relativamente barata y de funcionamiento sencillo y proporcionan análisis rápidos sin necesidad de un equipo de laboratorio. En los ensayos LFI, los anticuerpos se obtienen típicamente al inocular la sustancia de interés a un animal, después de lo cual el animal produce anticuerpos hacia esa sustancia. Esta relación bioquímica es por ello utilizada como mecanismo para aislar y detectar la sustancia de interés. Los ensayos LFI son tanto sensibles como específicos y se comparan bien con los radioinmunoensayos ("RIA"). Los ensayos LFI presentan la ventaja adicional de no necesitar radioisótopos ni un aparato para contar radiaciones.

20 En la realización preferida, el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas del presente invento incluye dos tiras de ensayo que están contenidas en una o dos cavidades de plástico. Se ponen los excrementos de un caballo que se van a ensayar en un recipiente (que puede ser, por ejemplo, un cubo, un balde, una bolsa de plástico o un vaso), se añade una disolución (que puede ser agua o agua con un tampón tal como sal) y se revuelve, agita o amasa la mezcla para mezclar todo a fondo. Se usa un aplicador tal como un cuentagotas para dejar caer varias gotas de líquido del recipiente sobre las tiras de ensayo de las cavidades.

25 A lo largo de un período de tiempo que varía preferiblemente de aproximadamente cinco minutos a aproximadamente treinta minutos, las dos tiras de ensayo proporcionarán un marcador visual que representa el indicador testigo y, si están presentes los indicadores para los que se realiza el ensayo, marcadores visuales que significan la detección de aquellos indicadores que son respectivamente indicativos de la presencia de úlceras o sangrías gástricas y/o úlceras o sangrías colónicas. En el presente invento se utilizan dos indicadores, de los cuales uno es indicativo de la presencia de una úlcera o sangría gástrica y el otro es indicativo de la presencia de una úlcera o sangría colónica.

30 En la realización preferida, la sustancia de interés que, cuando se detecte, proporcionará una indicación de la presencia de una úlcera o sangría colónica es albúmina equina, y la sustancia de interés que, cuando se detecte, proporcionará una indicación de la presencia de una úlcera o sangría gástrica o una úlcera o sangría colónica, o de ambas, úlceras o sangrías gástricas y colónicas, es hemoglobina equina. Por ello, el método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas del presente invento permiten diagnosticar úlceras o sangrías gástricas y/o colónicas, proporcionando una base inmediata para un tratamiento.

35 Por lo tanto, se puede ver que el presente invento enseña un kit de ensayo para úlceras y sangrías del tracto digestivo equinas y un método relacionado para la preparación del kit de ensayo, que son eficaces en el diagnóstico tanto de úlceras o sangrías gástricas como de úlceras o sangrías colónicas, así como de otras sangrías del tracto digestivo, en caballos. El método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas del presente invento proporcionan una indicación muy específica en cuanto a la presencia de úlceras o sangrías gástricas o úlceras o sangrías colónicas, o ambas. El método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas del presente invento son muy fiables tanto en cuanto a la identificación de la existencia de úlceras o sangrías en un caballo como en cuanto a la identificación del(de los) tipo(s) de las úlceras que están presentes en el caballo, y no producen excesivas lecturas positivas falsas.

40 El método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas son tanto sencillos como rápidos de llevar a cabo y no requieren ninguna experiencia ni entrenamiento especiales para que un usuario lleve el ensayo a cabo. El kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas es completamente autónomo y no requiere un análisis de laboratorio ni un equipo de procesamiento adicional, lo que permite que se pueda hacer funcionar en cualquier parte como un ensayo de campo. El método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas proporcionan rápidamente los resultados del ensayo, en minutos en lugar de requerir un tiempo prolongado.

45 El kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas es de una construcción que es tanto duradera como resistente, y los kits de ensayo no requieren unas condiciones de almacenamiento especiales y tienen un prolongado tiempo de conservación. El kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas es además de una construcción barata para potenciar su interés comercial y de este modo conseguir el mercado más amplio posible. Finalmente, todas las susodichas ventajas y objetivos del método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas se alcanzan sin incurrir en ninguna desventaja relativa sustancial.

DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Estas y otras ventajas del presente invento se entienden mejor por referencia a los dibujos, en que:

La Figura 1 es un dibujo algo esquemático de un caballo, que muestra la anatomía del tracto digestivo de un caballo;

5 La Figura 2 es una vista isométrica que muestra un kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas que es construido y usado de acuerdo con las enseñanzas del presente invento y que tiene una primera cavidad que contiene una tira de ensayo para úlceras o sangrías gástricas y una segunda cavidad que contiene una tira de ensayo para úlceras o sangrías colónicas;

10 La Figura 3 es una vista isométrica que muestra una realización alternativa de un kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas, también construido y usado de acuerdo con las enseñanzas del presente invento y que tiene una única cavidad que contiene tanto una tira de ensayo para úlceras o sangrías gástricas como una tira de ensayo para úlceras o sangrías colónicas; y

La Figura 4 es una tabla que ilustra los resultados del kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas, según vienen indicados por la presencia o ausencia detectadas de albúmina equina y la presencia o ausencia detectadas de hemoglobina equina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA REALIZACIÓN PREFERIDA

15 Antes de una discusión sobre el método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas del presente invento, resulta útil discutir brevemente la anatomía del sistema digestivo de un caballo. Con relación a la Figura 1, se ilustra una vista lateral de un caballo 20, que ilustra esquemáticamente el tracto digestivo del caballo. El tracto digestivo del caballo 20 se puede separar en un intestino anterior, que viene indicado en general por el número 22 de referencia, y un intestino posterior, que viene indicado en general por el número 24 de referencia.

20 El tracto digestivo del caballo 20 comienza en su boca 26 y se extiende sucesivamente a través del esófago 28, el estómago 30 y luego el intestino delgado 32, que constituyen conjuntamente el intestino anterior 22 del caballo 20. El intestino anterior 22 del caballo 20 constituye aproximadamente del treinta y cinco al cuarenta por ciento de la capacidad relativa del tracto digestivo del caballo 20.

25 Desde el intestino delgado 32, el tracto digestivo se extiende a través del ciego 34, el colon mayor 36 y el colon menor 38 que termina en el recto 40. Estos elementos del tracto digestivo del caballo 20 constituyen conjuntamente el intestino posterior 24 del caballo 20. El intestino posterior 24 constituye aproximadamente del sesenta al sesenta y cinco por ciento de la capacidad relativa del tracto digestivo del caballo 20.

30 En la Figura 2 se muestra la realización preferida del kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas del presente invento. Se ilustra una primera cavidad 50 que contiene un kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas para detectar úlceras o sangrías gástricas. La cavidad primera 50 tiene una abertura 52 situada en ella, en la cual se introducirá el fluido que se va a analizar. En la cavidad primera 50 también está situada una ventana 54 de visualización a través de la cual es visible una membrana 56 de tira de ensayo que tiene una zona 58 de marcas distintivas de ensayo y una zona 60 de marcas distintivas testigo, situadas en ella. La zona 58 de marcas distintivas de ensayo se volverá visible cuando se detecte la presencia de la sustancia de interés, proporcionando por ello una indicación de la presencia de una úlcera o sangría gástrica.

35 En la Figura 2 también se muestra una segunda cavidad 70 que contiene un kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas para detectar úlceras o sangrías colónicas. La cavidad segunda 70 tiene una abertura 72 situada en ella, en la cual se introducirá el fluido que se va a analizar. En la cavidad segunda 70 también está situada una ventana 74 de visualización a través de la cual es visible una membrana 76 de tira de ensayo que tiene una zona 78 de marcas distintivas de ensayo y una zona 80 de marcas distintivas testigo, situadas en ella. La zona 78 de marcas distintivas de ensayo se volverá visible cuando se detecte la presencia de la sustancia de interés, proporcionando por ello una indicación de la presencia de una úlcera o sangría colónica. Aunque se muestran muy juntas, la cavidad primera 50 y la cavidad segunda 70 están separadas en la realización ilustrada en la Figura 2.

40 Con respecto ahora a la Figura 3, se ilustra un kit de ensayo de realización alternativa que tiene una sola cavidad 90. La cavidad 90 tiene una sola (aunque más ancha) abertura 92 situada en ella, en la cual se introducirá el fluido que se va a analizar. La cavidad 90 también tiene unas ventanas de visualización primera 94 y segunda 96 situadas en ella, en lados opuestos de ella. Visible a través de la primera ventana 94 de visualización hay una membrana 98 de tira de ensayo que tiene una zona 100 de marcas distintivas de ensayo y una zona 102 de marcas distintivas testigo, situadas en ella. La zona 100 de marcas distintivas de ensayo se volverá visible cuando se detecte la presencia de la sustancia de interés, proporcionando por ello una indicación de la presencia de una úlcera o sangría gástrica. La zona 102 de marcas distintivas testigo se volverá visible cuando se haya introducido suficiente fluido en la cavidad 90 a través de la abertura 92.

Visible a través de la segunda ventana 96 de visualización hay una membrana 104 de tira de ensayo que tiene una

zona 106 de marcas distintivas de ensayo y una zona 108 de marcas distintivas testigo, situadas en ella. La zona 106 de marcas distintivas de ensayo se volverá visible cuando se detecte la presencia de la sustancia de interés, proporcionando por ello una indicación de la presencia de una úlcera o sangría gástrica. La zona 108 de marcas distintivas testigo se volverá visible cuando se haya introducido suficiente fluido en la cavidad 90 a través de la abertura 92.

La construcción de las tiras 56 y 76 de ensayo de la Figura 2 y las tiras 98 y 104 de ensayo de la Figura 3 es bien conocida por los expertos en la técnica. Similarmente, la construcción de otros tipos distintos de kits de ensayo que tengan diferentes diseños de cavidad también es bien conocida por los expertos en la técnica. Las porciones esenciales de los dispositivos de ensayo mostrados en las Figuras 2 y 3 son el tipo y el origen de los anticuerpos que se usan para proporcionar los ensayos para úlceras o sangrías gástricas y colónicas, que se discutirán más adelante.

Antes de esa discusión, se proporcionará una breve descripción del funcionamiento de los kits de ensayo mostrados en las Figuras 2 y 3. Un veterinario, entrenador o propietario de caballos recoge una muestra fecal representativa (que varía de unos pocos gramos a una evacuación intestinal completa) del caballo que se va a examinar. Luego se pone la muestra fecal en un recipiente, tal como un cubo o balde o bolsa de plástico, y se mezcla con una disolución acuosa (que puede ser agua o agua con un tampón tal como sal) mediante revolvimiento, agitación o amasado. Utilizando un cuentagotas o cualquier otro mecanismo conveniente, el veterinario, entrenador o propietario de caballos introduce luego unas cuantas gotas del fluido en el(los) dispositivo(s) de ensayo a través de las aberturas 52 y 72 de las cavidades 50 y 70, respectivamente para la realización de la Figura 1, o a través de la abertura 92 de la cavidad 90 en la realización de la Figura 2.

En pocos minutos, las zonas 60 y 80 de marcas distintivas testigo se volverán visibles para la realización de la Figura 1, o las zonas 102 y 108 de marcas distintivas testigo se volverán visibles para la realización de la Figura 2, lo que indica el funcionamiento apropiado del kit de ensayo. Si se detecta albúmina equina, la zona 58 de marcas distintivas de ensayo se volverá visible para la realización de la Figura 1, o la zona 100 de marcas distintivas de ensayo se volverá visible para la realización de la Figura 2. Similarmente, si se detecta hemoglobina equina, la zona 78 de marcas distintivas de ensayo se volverá visible para la realización de la Figura 1, o la zona 106 de marcas distintivas de ensayo se volverá visible para la realización de la Figura 2. De este modo, el ensayo permite diagnosticar úlceras o sangrías gástricas y/o colónicas, lo que proporciona la base para un tratamiento inmediato si se detecta cualquiera de aquéllas o ambas.

Aunque los ejemplos ilustrados en las Figuras 2 y 3 muestran unas membranas separadas 56 y 76 de tiras de ensayo para la realización ilustrada en la Figura 2, y unas tiras separadas 98 y 104 de ensayo para la realización ilustrada en la Figura 3, los expertos en la técnica apreciarán inmediatamente que es posible combinar ambos ensayos sobre una sola membrana. Además, en lugar del ensayo anteriormente descrito en el que la aparición de unas marcas distintivas de ensayo indica la detección de albúmina equina o hemoglobina equina, también es posible utilizar la técnica de exclusión competitiva por la cual la aparición de marcas distintivas de ensayo indica la falta de detección de albúmina equina o hemoglobina equina.

En la realización preferida del método y kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas del presente invento, la sustancia de interés que, cuando se detecte, proporcionará una indicación de la presencia de una úlcera o sangría colónica es albúmina equina, y la sustancia de interés que, cuando se detecte, proporcionará una indicación de la presencia de una úlcera o sangría gástrica es hemoglobina equina. La elección de la albúmina equina para indicar la presencia de una úlcera o sangría colónica proporciona especificidad porque la albúmina equina detectada en las heces de 1 caballo sólo puede haberse originado en el colon. Esto es así porque la sangre de las úlceras o sangrías gástricas (y cualquier otra sangre craneal al duodeno, para esa cuestión) resultaría degradada por ácidos y peptidasas en el estómago, lo que haría que fuera muy improbable que la albúmina equina detectada en las heces tuviera su origen en una úlcera o sangría gástrica.

Sin embargo, es improbable que la acción de ácidos y peptidasas en el estómago degrade o digiera completamente la hemoglobina equina. La hemoglobina equina detectada en las heces podría haberse originado en el estómago y/o en el colon, indicando por ello una úlcera o sangría gástrica, una úlcera o sangría colónica, o ambas, una úlcera o sangría gástrica y una úlcera o sangría colónica. De este modo, la diferenciación entre úlceras o sangrías colónicas y gástricas depende de la presencia o ausencia de albúmina equina.

En relación con la Figura 4, se puede ver que si se detecta albúmina equina es seguro que está presente una úlcera o sangría colónica. Si no se detecta albúmina equina pero se detecta hemoglobina equina, es probable que esté presente una úlcera o sangría gástrica. Si no se detecta albúmina equina ni hemoglobina equina, es probable que no estén presentes úlceras o sangrías gástricas ni úlceras o sangrías colónicas. Finalmente, si se detecta tanto albúmina equina como hemoglobina equina, es probable que estén presentes úlceras o sangrías colónicas o ambas, úlceras o sangrías gástricas y úlceras o sangrías colónicas. De esta manera, los expertos en la técnica apreciarán que el método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas del presente invento proporcionan por ello un mecanismo y un método para diagnosticar úlceras o sangrías gástricas y/o colónicas, permitiendo que se proporcione con fiabilidad un tratamiento para estas úlceras.

EL ENSAYO DE ALBÚMINA EQUINA

5 El ensayo de albúmina equina es un inmunoensayo monoclonal/policlonal muy sensible. Hay cuatro fases distintas en la creación de dicho inmunoensayo; es decir, inmunización, fusión, clonación y producción. La primera fase es la inmunización, en la que se inyectan secuencias peptídicas de albúmina equina procedentes de la secuencia genética para la albúmina equina, que es única para la especie equina, a un conejo, ratón, rata, cobaya u otro animal de ensayo adecuado. Esto provocará una reacción inmune en el animal de ensayo, que creará grandes cantidades de anticuerpos en su sangre y en su bazo.

10 Aproximadamente a las seis semanas, se puede extraer sangre de los animales y se puede examinar ésta en cuanto a anticuerpos utilizando un ensayo ELISA. Esto implica hacer reaccionar la sangre del animal de ensayo con los sueros de caballo *in vitro*. Si están presentes anticuerpos, el ELISA cambiará de color. Si está presente un nivel insuficiente de anticuerpos, puede ser que los animales de ensayo requieran una o más inyecciones de refuerzo de albúmina equina. Estas primeras sangrías se pueden utilizar para producir anticuerpos policlonales. Típicamente, esta fase dura aproximadamente tres meses. Los anticuerpos policlonales de esta fase se pueden utilizar para la construcción de kits de ensayo.

15 La segunda fase es la fusión, en la que se sacrifican los animales de ensayo y se maceran sus bazos para liberar las células que crean los anticuerpos equinos. Estas células pueden ser luego fusionadas con una línea celular de mieloma con objeto de inmortalizarlas, como se describe en la Patente de EE.UU. nº 5.552.295, concedida a Stanker et al. Una vez inmortalizadas, estas células pueden ser cultivadas indefinidamente para obtener un suministro continuo de anticuerpos.

20 Los hibridomas (células fusionadas) son luego sembrados en diversas placas de noventa y seis pocillos para microtitulación. Estas células son enfrentadas a otro ensayo ELISA, y aquéllas que muestran la apropiada reacción de anticuerpos pueden ser multiplicadas en pocillos para microtitulación adicionales. Estas células son adicionalmente examinadas mediante un ensayo ELISA para obtener una línea pura de células que producen los anticuerpos deseados, durando típicamente esta fase de aproximadamente cinco a seis semanas.

25 La tercera fase es la clonación, en la que las células que han dado positivo en la segunda fase son clonadas y adicionalmente examinadas mediante un ensayo ELISA. Se pueden necesitar varios ciclos de clonación para desarrollar clones estables. Estos clones pueden ser luego inyectados en abdómenes de ratones, donde producen fluido ascítico. Los anticuerpos monoclonales son purificados del fluido ascítico y están entonces listos para ser utilizados. Resultará inmediatamente evidente a los expertos en este campo técnico que esta técnica permitirá producir nuevos anticuerpos monoclonales específicamente dirigidos hacia albúmina equina. La tercera fase dura típicamente cerca de tres meses.

30 Alternativamente, se pueden inmunizar gallinas con el antígeno, las cuales producirán anticuerpo en las yemas de sus huevos. En esta técnica no se necesitan las fases de clonación anteriormente mencionadas ya que la gallina pondrá huevos suficientes para proporcionar los anticuerpos. Sin embargo, las fases de purificación de estos anticuerpos son similares a las anteriormente descritas.

35 La fase cuarta y final es la producción de kits de ensayo. Se pinta una membrana porosa de nitrocelulosa o nailon con los anticuerpos, como es convencional en la técnica. Cuando se pone albúmina equina sobre el dispositivo de ensayo, se filtra a través de la membrana, se encuentra con anticuerpos etiquetados que llevan un agente colorante y resulta finalmente atrapada por los anticuerpos de la zona de marcas distintivas de ensayo. Allí, la concentración de anticuerpos etiquetados causará un cambio de color que indicará claramente la presencia de albúmina equina en las heces del caballo que se está examinando. De este modo, los expertos en la técnica apreciarán que este nuevo ensayo de anticuerpos es tanto muy sensible [la sensibilidad puede ser tan elevada como aproximadamente una parte en un millón (un microgramo por mililitro)] como específico para albúmina equina.

EL ENSAYO DE HEMOGLOBINA EQUINA

45 El ensayo de hemoglobina equina es un inmunoensayo monoclonal/policlonal muy sensible. Hay cuatro fases distintas en la creación de dicho inmunoensayo; es decir, inmunización, fusión, clonación y producción. La primera fase es la inmunización, en la que se inyectan secuencias peptídicas de hemoglobina equina procedentes de la secuencia genética para la hemoglobina equina, que es única para la especie equina, a un conejo, ratón, rata, cobaya u otro animal de ensayo adecuado. Esto provocará una reacción inmune en el animal de ensayo, que creará grandes cantidades de anticuerpos en su sangre y en su bazo.

50 Aproximadamente a las seis semanas, se puede extraer sangre de los animales y se puede examinar ésta en cuanto a anticuerpos utilizando un ensayo ELISA. Esto implica hacer reaccionar la sangre del animal de ensayo con los sueros de caballo *in vitro*. Si están presentes anticuerpos, el ELISA cambiará de color. Si está presente un nivel insuficiente de anticuerpos, puede ser que los animales de ensayo requieran una o más inyecciones de refuerzo de hemoglobina equina. Estas primeras sangrías se pueden utilizar para producir anticuerpos policlonales. Típicamente, esta fase dura aproximadamente tres meses. Los anticuerpos policlonales de esta fase se pueden utilizar para la construcción de kits de ensayo.

La segunda fase es la fusión, en la que se sacrifican los animales de ensayo y se maceran sus bazos para liberar las células que crean los anticuerpos equinos. Estas células pueden ser luego fusionadas con una línea celular de mieloma con objeto de inmortalizarlas, como se describe en la Patente de Stanker et al. a la que antes se hizo referencia. Una vez inmortalizadas, estas células pueden ser cultivadas indefinidamente para obtener un suministro continuo de anticuerpos.

Los hibridomas (células fusionadas) son luego sembrados en diversas placas de noventa y seis pocillos para microtitulación. Estas células son enfrentadas a otro ensayo ELISA, y aquéllas que muestran la apropiada reacción de anticuerpos pueden ser multiplicadas en pocillos para microtitulación adicionales. Estas células son adicionalmente examinadas mediante un ensayo ELISA para obtener una línea pura de células que producen los anticuerpos deseados, durando típicamente esta fase de aproximadamente cinco a seis semanas.

La tercera fase es la clonación, en la que las células que han dado positivo en la segunda fase son clonadas y adicionalmente examinadas mediante un ensayo ELISA. Se pueden necesitar varios ciclos de clonación para desarrollar clones estables. Estos clones pueden ser luego inyectados en abdómenes de ratones, donde producen fluido ascítico. Los anticuerpos monoclonales son purificados del fluido ascítico y están entonces listos para ser utilizados. Resultará inmediatamente evidente a los expertos en este campo técnico que esta técnica permitirá producir nuevos anticuerpos monoclonales específicamente dirigidos hacia hemoglobina equina. La tercera fase dura típicamente cerca de tres meses.

Alternativamente, se pueden inmunizar gallinas con el antígeno, las cuales producirán anticuerpo en las yemas de sus huevos. En esta técnica no se necesitan las fases de clonación anteriormente mencionadas ya que la gallina pondrá huevos suficientes para proporcionar los anticuerpos. Sin embargo, las fases de purificación de estos anticuerpos son similares a las anteriormente descritas.

La fase cuarta y final es la producción de kits de ensayo. Se pinta una membrana porosa de nitrocelulosa o nailon con los anticuerpos, como es convencional en la técnica. Cuando se pone hemoglobina equina sobre el dispositivo de ensayo, se filtra a través de la membrana, se encuentra con anticuerpos etiquetados que llevan un agente colorante y resulta finalmente atrapada por los anticuerpos de la zona de marcas distintivas de ensayo. Allí, la concentración de anticuerpos etiquetados causará un cambio de color que indicará claramente la presencia de hemoglobina equina en las heces del caballo que se está examinando. De este modo, los expertos en la técnica apreciarán que este nuevo ensayo de anticuerpos es tanto muy sensible [la sensibilidad puede ser tan elevada como aproximadamente una parte en un millón (un microgramo por mililitro)] como específico para hemoglobina equina.

EL ENSAYO DE COMBINACIÓN

Al combinar el ensayo de albúmina equina con el ensayo de hemoglobina equina en un solo kit de ensayo, se puede crear un ensayo sencillo, barato, muy sensible y diagnósticamente específico para úlceras o sangrías equinas. Alternativamente, se pueden proporcionar los dos ensayos en kits de ensayo separados. En la realización preferida, las dos tiras de ensayo están conectadas con un solo pocillo, por lo que bastará una sola aplicación del líquido fecal para ambas.

El que el ensayo de albúmina equina sea positivo indica una úlcera o sangría colónica. El que sólo el ensayo de hemoglobina equina sea positivo indica una úlcera o sangría gástrica. El que ambos resultados sean positivos indica entonces una úlcera o sangría colónica o ambas, una úlcera o sangría gástrica y una úlcera o sangría colónica. Los expertos en la técnica apreciarán que este ensayo doble puede proporcionar un ensayo conveniente y no invasivo para úlceras o sangrías gástricas (que son actualmente difíciles y caras de diagnosticar) así como para úlceras o sangrías colónicas (para las que no existe un ensayo actual capaz de proporcionar un diagnóstico preciso).

Aunque el método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas se centran en el diagnóstico tanto de úlceras o sangrías gástricas como de úlceras o sangrías colónicas en caballos, se contempla que también se puedan usar para el diagnóstico de úlceras o sangrías gástricas y úlceras o sangrías colónicas en otros animales. El kit de ensayo particular para úlceras o sangrías puede ser específicamente diseñado para el animal particular con el que se utilizará para detectar la albúmina y la hemoglobina del animal particular. Alternativamente, se puede preparar un kit de ensayo más genérico para úlceras o sangrías gástricas y úlceras o sangrías colónicas de animales, al proporcionar un anticuerpo hacia albúmina que se una específicamente con la albúmina de una pluralidad de diferentes animales y un anticuerpo hacia hemoglobina que se una específicamente a la hemoglobina de una pluralidad de diferentes animales.

Con la descripción anteriormente detallada se enseñan un kit de ensayo para sangrías del tracto digestivo y úlceras equinas y un método relacionado para la preparación del kit de ensayo, que son eficaces en el diagnóstico tanto de úlceras o sangrías gástricas como de úlceras o sangrías colónicas en caballos. El método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas proporcionan una indicación muy específica en cuanto a la presencia de úlceras o sangrías gástricas o úlceras o sangrías colónicas, o ambas. El método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas son muy fiables tanto en cuanto a la identificación de la existencia de úlceras o sangrías en un caballo como en cuanto a la identificación del(de los) tipo(s) de las úlceras o la localización de las sangrías que están presentes en el caballo, y no producen excesivas lecturas positivas falsas.

5 El método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas son tanto simples como rápidos de llevar a cabo y no requieren ninguna experiencia ni entrenamiento especiales para que un usuario lleve el ensayo a cabo. El kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas es completamente autónomo y no requiere un análisis de laboratorio ni un equipo de procesamiento adicional, lo que permite que se pueda hacer funcionar en cualquier parte como un ensayo de campo. El método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas proporcionan rápidamente los resultados del ensayo, en minutos en lugar de requerir un tiempo prolongado.

10 El kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas es de una construcción que es tanto duradera como resistente, y los kits de ensayo no requieren unas condiciones de almacenamiento especiales y tienen un prolongado tiempo de conservación. El kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas es también de una construcción barata para potenciar su interés comercial y de este modo conseguir el mercado más amplio posible. Finalmente, todas las susodichas ventajas y objetivos del método y el kit de ensayo para úlceras o sangrías equinas se alcanzan sin incurrir en ninguna desventaja relativa sustancial.

REIVINDICACIONES

1. Un kit de ensayo rápido para la detección y localización de úlceras o sangrías del tracto digestivo en equinos, que comprende:
 - 5 una primera tira de ensayo para un inmunoensayo o una reacción de peroxidasa rápidos para detectar la presencia de una úlcera o sangría gástrica y/o una úlcera o sangría colónica en un equino;
 - en que dicha primera tira de ensayo permite detectar la presencia de hemoglobina equina, que es indicativa de la presencia de una úlcera o sangría gástrica y/o una úlcera o sangría colónica en un equino; y
 - una segunda tira de ensayo para un inmunoensayo rápido para detectar la presencia de una úlcera o sangría colónica en un equino;
 - 10 en que dicha segunda tira de ensayo permite detectar la presencia de albúmina equina, que es indicativa de la presencia de una úlcera o sangría colónica en un equino.
 2. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 1, en que dicha primera tira de ensayo contiene un anticuerpo anti-hemoglobina equina que se une específicamente a la hemoglobina equina.
 3. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 2, en que dicho anticuerpo anti-hemoglobina equina es un anticuerpo monoclonal.
 - 15 4. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 2, en que dicho anticuerpo anti-hemoglobina equina es un anticuerpo policlonal.
 5. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 2, en que dicho anticuerpo anti-hemoglobina equina es aislado del suero sanguíneo o los bazos macerados de conejos, ratones, ratas o cobayas sometidos a inoculación.
 - 20 6. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 2, en que dicho anticuerpo anti-hemoglobina equina es producido por una línea celular de hibridoma que produce y secreta anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la hemoglobina equina.
 7. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 2, en que dicho anticuerpo anti-hemoglobina equina es producido mediante la expresión de anticuerpos hacia hemoglobina equina por células inmunes que han sido hibridadas con líneas de mieloma inmortales.
 - 25 8. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 7, en que dichas células inmunes son aisladas del suero sanguíneo o los bazos macerados de conejos, ratones, ratas o cobayas sometidos a inoculación.
 9. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 1, en que dicha primera tira de ensayo también contiene un indicador testigo para demostrar que el ensayo ha sido llevado a cabo apropiadamente.
 - 30 10. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 1, en que dicha segunda tira de ensayo contiene un anticuerpo anti-albúmina equina que se une específicamente a la albúmina equina.
 11. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 10, en que dicho anticuerpo anti-albúmina equina es un anticuerpo monoclonal.
 - 35 12. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 10, en que dicho anticuerpo anti-albúmina equina es un anticuerpo policlonal.
 13. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 10, en que dicho anticuerpo anti-albúmina equina es aislado del suero sanguíneo o los bazos macerados de conejos, ratones, ratas o cobayas sometidos a inoculación.
 - 40 14. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 10, en que dicho anticuerpo anti-albúmina equina es producido por una línea celular de hibridoma que produce y secreta anticuerpos monoclonales que se unen específicamente a la albúmina equina.
 15. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 10, en que dicho anticuerpo anti-albúmina equina es producido mediante la expresión de anticuerpos hacia albúmina equina por células inmunes que han sido hibridadas con líneas de mieloma inmortales.
 - 45 16. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 15, en que dichas células inmunes son aisladas del suero sanguíneo o los bazos macerados de conejos, ratones, ratas o cobayas sometidos a inoculación.
 17. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 1, en que dicha segunda tira de ensayo contiene

un indicador testigo para demostrar que el ensayo ha sido llevado a cabo apropiadamente.

18. Un kit de ensayo rápido como el definido en la Reivindicación 1, en que dichas tiras de ensayo primera y segunda comprenden:

- 5 una única tira de ensayo para detectar tanto la presencia de hemoglobina equina, que es indicativa de la presencia de una úlcera o sangría gástrica y/o una úlcera o sangría colónica en un equino, como la presencia de albúmina equina, que es indicativa de la presencia de una úlcera o sangría colónica en un equino.

19. Un método para preparar un kit de ensayo rápido para la detección y localización de úlceras o sangrías del tracto digestivo en equinos, que comprende:

- 10 proporcionar una primera tira de ensayo para un inmunoensayo o una reacción de peroxidasa rápidos para detectar la presencia de una úlcera o sangría gástrica y/o una úlcera o sangría colónica en un equino;

en que dicha primera tira de ensayo se proporciona para detectar la presencia de hemoglobina equina, que es indicativa de la presencia de una úlcera o sangría gástrica y/o una úlcera o sangría colónica en un equino; y

proporcionar una segunda tira de ensayo para un inmunoensayo rápido para detectar la presencia de una úlcera o sangría colónica en un equino;

- 15 en que dicha segunda tira de ensayo se proporciona para detectar la presencia de albúmina equina, que es indicativa de la presencia de una úlcera o sangría colónica en un equino.

20. Un método como el definido en la Reivindicación 19, en que dicha primera tira de ensayo contiene un anticuerpo anti-hemoglobina equina que se une específicamente a la hemoglobina equina.

- 20 21. Un método como el definido en la Reivindicación 19, en que dicha segunda tira de ensayo contiene un anticuerpo anti-albúmina equina que se une específicamente a la albúmina equina.

22. Un método como el definido en la Reivindicación 19, en que dicha primera tira de ensayo también contiene un indicador testigo para demostrar que el ensayo ha sido llevado a cabo apropiadamente, y en que dicha segunda tira de ensayo también contiene un indicador testigo para demostrar que el ensayo ha sido llevado a cabo apropiadamente.

- 25 23. Un método como el definido en la Reivindicación 19, en que dichas tiras de ensayo primera y segunda comprenden:

una única tira de ensayo para detectar tanto la presencia de hemoglobina equina como la presencia de albúmina equina.

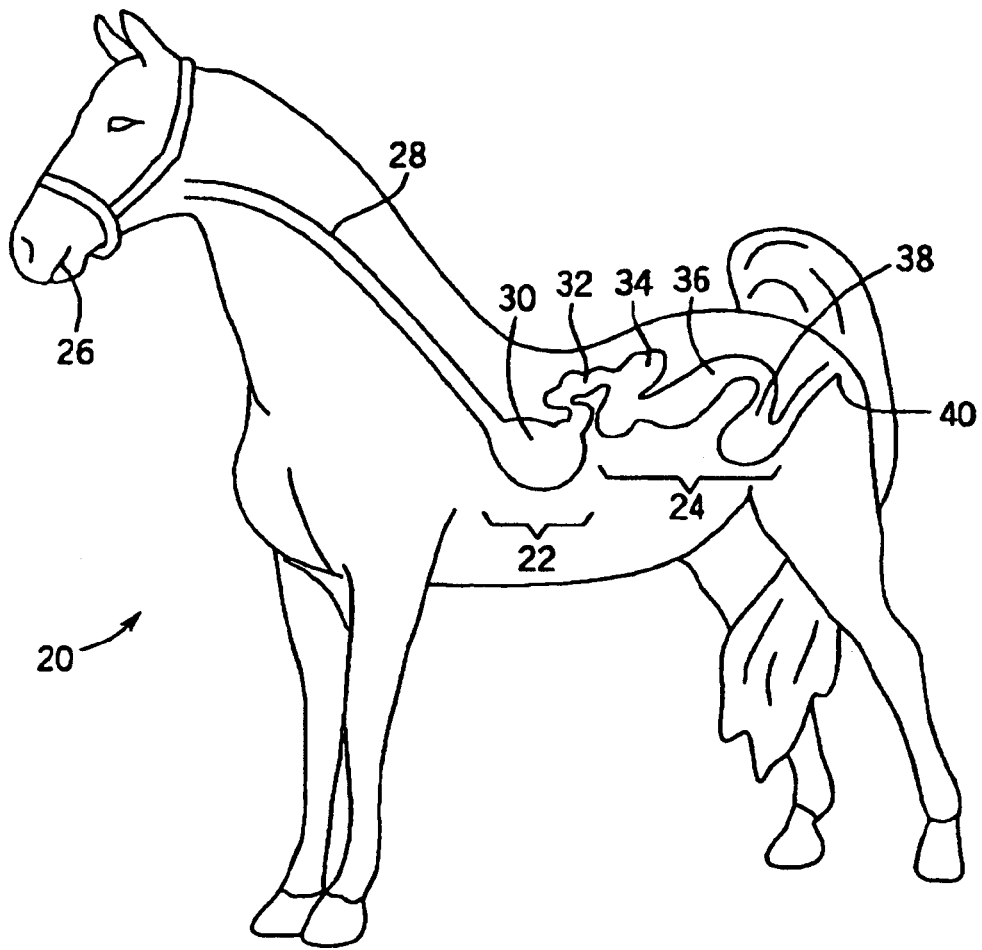


FIG. 1

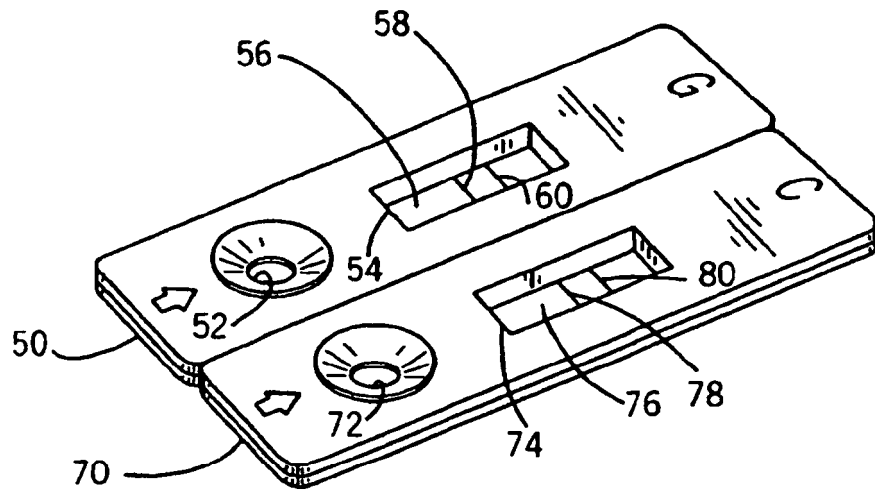


FIG. 2

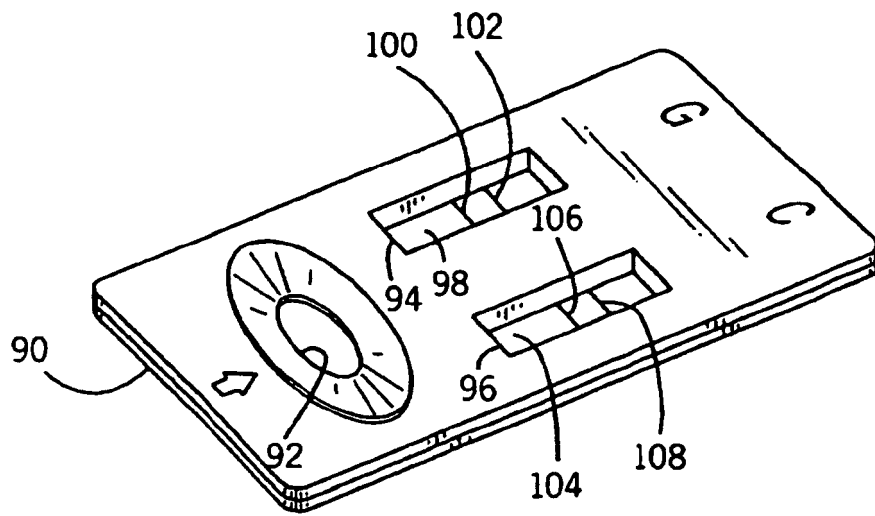


FIG. 3

	SIN ALBÚMINA	ALBÚMINA PRESENTE
SIN HEMOGLOBINA	ÚLCERAS NO PRESENTES	ÚLCERAS COLÓNICAS DETECTADAS
HEMOGLOBINA PRESENTE	ÚLCERAS GÁSTRICAS DETECTADAS	ÚLCERAS COLÓNICAS O TANTO ÚLCERAS GÁSTRICAS COMO COLÓNICAS DETECTADAS

FIG. 4