

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 408**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/00**

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.04.2003 E 03719550 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.03.2013 EP 1576350**

54 Título: **Péptidos para la detección de anticuerpos de A. phagocytophila**

30 Prioridad:

**12.04.2002 US 121799**

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

**20.09.2013**

73 Titular/es:

**IDEXX LABORATORIES, INC. (100.0%)  
ONE IDEXX DRIVE  
WESTBROOK, ME 04092, US**

72 Inventor/es:

**O'CONNOR, THOMAS PATRICK y  
CHANDRASHEKAR, RAMASWAMY**

74 Agente/Representante:

**ISERN CUYAS, María Luisa**

**ES 2 423 408 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).

## DESCRIPCION

Péptidos para la detección de anticuerpos de *A. phagocytophila*.

La invención se refiere a métodos y composiciones para la detección y cuantificación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo *A. phagocytophila*. *A. phagocytophila* es conocida formalmente como *Ehrlichia equi*.

**Antecedentes de la invención**

La ehrlichiosis granulocítica ocurre en mamíferos como los humanos, los caballos, los perros y los gatos y es causada por la infección de las células granulocítica con el agente de garrapatas *A. phagocytophila* (antiguamente conocida como *Ehrlichia equi*). Síntomas frecuentemente reportados de ehrlichiosis granulocítica en los seres humanos son leucopenia y trombocitopenia. Signos clínicos más comunes en los perros y los caballos son fiebre y anorexia.

Ensayos de inmunofluorescencia indirecta (IFA) y ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) se utilizan con frecuencia como ayuda en el diagnóstico de enfermedades causadas por *A. phagocytophila* mediante la medición de la unión de anticuerpo a partir de la sangre de un paciente o en el suero de las células infectadas, lisados celulares o proteínas purificadas de *ehrlichia*. Sin embargo, estos ensayos están severamente limitados en utilidad debido a problemas de sensibilidad y especificidad relacionados directamente con la naturaleza impura del antígeno utilizado en estas pruebas. Se necesitan reactivos altamente purificados para construir ensayos más precisos. Esta invención describe secuencias de péptidos sintéticos específicos derivados de *A. phagocytophila* que se pueden utilizar en lugar de las proteínas parcialmente purificadas, las células infectadas o lisados celulares.

**Sumario de la invención**

Es un objeto de la invención es proporcionar métodos y composiciones para la detección y cuantificación de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos *A. phagocytophila*. Este y otros objetos de la invención se proporcionan por una o más de las realizaciones descritas a continuación.

Una realización de la invención proporciona una composición de materia que consiste esencialmente en un polipéptido aislado que se muestra en SEQ ID NO: 1. La composición puede comprender un vehículo. El polipéptido aislado de la composición puede ser conjugado con albúmina de suero bovino. La invención también comprende un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido aislado de la composición.

Otra realización de la invención proporciona un método para detectar anticuerpos específicos para *A. phagocytophila*. El método comprende poner en contacto un polipéptido que se muestra en SEQ ID NO: 1, o una combinación de dos polipéptidos SEQ ID NO: 1, y SEQ ID NO: 3 con una muestra de ensayo sospechosa de que comprende anticuerpos que son específicos para *A. phagocytophila*, en condiciones que permiten formar complejos polipéptidos/anticuerpos. El polipéptido puede estar unido a un sustrato y puede estar en una forma multimérica. La muestra de ensayo puede ser una muestra biológica obtenida de un mamífero, tal como un ser humano, gato, caballo o perro. Se detectan complejos polipéptidos/ anticuerpos. La detección de complejos polipéptidos/anticuerpos es una indicación de que los anticuerpos específicos para *A. phagocytophila* están presentes en la muestra de ensayo. Los complejos polipéptidos/ anticuerpos pueden poner en contacto con un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal antes de la etapa de detección. Los anticuerpos pueden ser fragmentos de anticuerpos. La cantidad de anticuerpo en una muestra de ensayo se puede determinar utilizando este método. El método puede comprender un ensayo seleccionado del grupo de ensayos que consisten en un ensayo de unión cromatográfico de flujo reversible, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, un radióinmunoensayo, un ensayo de hemaglutinación un ensayo de western blot, un inmunoensayo de polarización de fluorescencia y un ensayo de inmunofluorescencia indirecta.

Todavía otra forma de realización de la invención comprende un artículo de fabricación que comprende material de envasado y, contenidos dentro del material de envasado, un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1, o una combinación de dos polipéptidos mostrados en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3. El material de envasado puede comprender una etiqueta que indica que los uno o más polipéptidos se pueden utilizar para la identificación de infección por *A. phagocytophila* en un mamífero.

Aún otra realización de la invención proporciona un método para diagnosticar una infección por *A. phagocytophila* en un mamífero. El método comprende obtener una muestra biológica de un mamífero que se sospecha que tiene una infección por *A. phagocytophila* y en contacto un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1, o una combinación de dos polipéptidos mostrados en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3, con la muestra biológica en condiciones que permiten formar polipéptido/anticuerpo complejos. Se detectan los complejos polipéptido/anticuerpo. La detección de complejos polipéptido/anticuerpo es una indicación de que el mamífero tiene una infección por *A. phagocytophila*. Los complejos de polipéptido/ anticuerpo pueden poner en contacto con un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal antes de la etapa de detección. El mamífero puede ser un ser humano, gato, caballo o perro.

Otra realización de la invención proporciona un anticuerpo que se une específicamente a al menos un epítipo de un polipéptido de *A. phagocytophila*, en el que dicho polipéptido es SEC ID NO: 1. El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal.

5 Por consiguiente, la invención proporciona métodos y composiciones que se pueden utilizar para detectar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos *A. phagocytophila* con una mayor sensibilidad y especificidad.

#### Descripción detallada de la invención

10 Las regiones inmunodominantes de una proteína de *E. canis* P30 previamente han sido identificados utilizando la tecnología de presentación en fagos. Véase la solicitud de patente US 09/765,736 presentada el 18 de enero de 2001. Las secuencias identificadas presentaron una fuerte homología con secuencias de proteínas de membrana externa de varias cepas de *Ehrlichia canis*. Los péptidos sintéticos correspondientes a las secuencias de las regiones homólogas de varias proteínas de membrana externa han sido sintetizados y utilizados en ensayos de diagnóstico para detectar anticuerpos y fragmentos de anticuerpos contra *E. canis*.

15 *A. phagocytophila* y *E. canis* son diferentes especies de organismos relacionados que están clasificados en los diferentes serotipos del grupo *Ehrlichia*. Se examinaron secuencias de polipéptido de *A. phagocytophila* para identificar las regiones inmunodominantes. Fueron identificadas secuencias inmunodominantes derivadas de una proteína de membrana de *A. phagocytophila*, GE E8 msp-2, por comparación con polipéptidos inmunodominantes *E. canis* (Murphy et al., *Infection and Immunity*, Vol 66 (8), pp. 3711-3718 (1998)). Las siguientes secuencias, que corresponden a los aminoácidos números 74 a 99, 62 a 92 y 120 a 139 de una proteína de membrana *A. phagocytophila*, se identificaron y se utilizaron como base para sintetizar dos péptidos sintéticos:

25

Péptido I. Aminoácidos Nos. 74-99  
KDGKSVKLESHKFDWNTDPDRIGFKD (SEQ ID NO: 1)

30

Péptido II. Aminoácidos No. 120-139  
LEIGYERFKTKGIRDSEGSKE (SEQ ID NO: 3)

#### **Polipéptidos *A. phagocytophila***

35 En una forma de realización de la invención, un polipéptido o fragmento del mismo es sustancialmente puro. Sustancialmente puro significa que un polipéptido de la invención está sustancialmente libre de otras moléculas biológicas. Un polipéptido sustancialmente puro es al menos 75%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99% o 100% puro en peso seco. La pureza puede medirse por un método tal como cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis por HPLC.

40

45 Los polipéptidos de la invención también pueden comprender variantes conservadoras de los polipéptidos mostrados en la SEQ ID NO: 1. Una variante conservadora es un polipéptido que difiere de la SEQ ID NO: 1, o un fragmento de la misma, sólo en sustituciones conservadoras, de tal manera que las propiedades antigénicas del polipéptido son sustancialmente la misma que la original de polipéptido. Las variantes conservadoras se pueden identificar generalmente mediante la modificación de una secuencia de polipéptido de la invención y la evaluación de la actividad antigénica del polipéptido modificado utilizando, por ejemplo, un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), o un ensayo de western blot. Una variante, incluyendo una variante conservadora y una variante antigénicamente activo se unirá a un anticuerpo anti-*A. phagocytophila* o fragmento de anticuerpo con sustancialmente la misma especificidad de unión de un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1. "Especificidad de unión" o "se une específicamente" significa que un polipéptido reconocerán sustancialmente y unirse a un anticuerpo anti-*A. phagocytophila* policlonal o monoclonal o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un Fv, Fv de cadena sencilla, Fab', o fragmento F(ab')<sub>2</sub>), pero no se une sustancialmente a otras moléculas en una muestra de ensayo. La unión específica se puede probar usando, por ejemplo, un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), o un ensayo de western blot. Los polipéptidos de la invención pueden comprender hasta aproximadamente 1, 2, 3, 5, 6, 10, o 15 sustituciones conservativas de aminoácidos.

55

60 Una sustitución conservativa es una en la que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de tal manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido fueran sustancialmente iguales. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservadores: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Es decir, los aminoácidos dentro de cada uno de los grupos pueden ser sustituidos por otro aminoácido del mismo grupo.

65

Un polipéptido de la invención o fragmentos del mismo puede diferir de la secuencia correspondiente en SEQ ID NO: 1 y aún retener sustancialmente la misma actividad antigénica del polipéptido o fragmento original. Esta es una variante antigénicamente activa o un fragmento activo antigénicamente. Una variante conservadora es un tipo de

una variante antigénicamente activo o fragmento. Hay variantes antigénicamente activas presentes en la naturaleza, tales como variantes alélicas y variantes antigénicamente activas de origen no natural, están incluidas en la invención y pueden ser producidas por, por ejemplo, técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

Una variante antigénicamente activa difiere por alrededor de, por ejemplo, 1, 2, 3, 5, 6, 10, 15 o 20 residuos de aminoácidos de un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1. Cuando esta comparación requiere la alineación de las secuencias se alinean para una máxima homología. Deleciones, inserciones, sustituciones, repeticiones, inversiones o desajustes se consideran las diferencias. Las diferencias son, preferiblemente, diferencias o cambios en un residuo no esencial o una sustitución conservativa. El sitio de variación puede ocurrir en cualquier lugar en el polipéptido, siempre que la variante de polipéptido resultante es sustancialmente similar a la antigenicidad de un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1.

Un polipéptido es una variante antigénicamente activa o un fragmento antigénicamente activo si reacciona sustancialmente igual que un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1 en un ensayo como un ensayo inmunohistoquímico, un ELISA, un RIA, un IFA o un ensayo de western blot, por ejemplo, tiene alrededor de 90-110% de la actividad del polipéptido original. En una forma de realización, el ensayo es un ensayo de competición en el que la variante antigénicamente activo polipéptido o fragmento es capaz de reducir la unión de un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1 a un antígeno o anticuerpo reactivo correspondiente por alrededor de 90, 95, 99, o 100%.

Por lo tanto, la invención proporciona polipéptidos variantes antigénicamente activos que pueden ser al menos 85% idéntica, más preferiblemente al menos 90% idéntica, y aún más preferiblemente al menos 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% idéntica a una secuencia de polipéptido mostrada en la SEQ ID NO: 1.

Identidad o idéntico significa similitud en la secuencia de aminoácidos y tiene un significado reconocido en la técnica. Las secuencias con identidad comparten aminoácidos idénticos o similares, donde los aminoácidos similares son preferiblemente aminoácidos conservados. Por lo tanto, una secuencia candidata compartiendo 90% de identidad de secuencia de aminoácidos con una secuencia de referencia (es decir, SEQ ID NO: 1) requiere que, tras la alineación de la secuencia candidata con la secuencia de referencia, el 90% de los aminoácidos en la secuencia candidata son idénticos a los aminoácidos correspondientes en la secuencia de referencia, y/o constituyan cambios conservativos de aminoácidos.

Las secuencias se alinean para cálculos de identidad usando un algoritmo matemático, como el algoritmo de Karlin y Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modificado como en Karlin y Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. Tal algoritmo se incorpora en los programas XBLAST de Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410. Búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos con identidad con los polipéptidos de la invención. Para obtener alineaciones con lagunas para propósitos de comparación, Gapped BLAST se puede utilizar como se describe en Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Cuando se utilizan los programas BLAST Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST). Lagunas internas e inserciones de aminoácidos en la secuencia candidata alineadas se ignoran como al hacer el cálculo de identidad.

Los procedimientos para introducir una mutación en aminoácidos de una proteína son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel (ed.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc. (1994); T. Maniatis, EF Fritsch y J. Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989). Las mutaciones también pueden introducirse utilizando kits disponibles comercialmente, tales como "QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit" (Stratagene). La generación de un polipéptido antigénico sustancialmente equivalente a un polipéptido que se muestra en SEQ ID NO: 1 mediante la sustitución de un aminoácido que no influye en la antigenicidad de un polipéptido de la invención puede ser llevado a cabo por un experto en la materia.

Los polipéptidos de la invención comprenden al menos un epítipo que es reconocido por un anticuerpo anti- *A. phagocytophila* o fragmento de anticuerpo. Un epítipo es un determinante antigénico de un polipéptido. Un epítipo puede ser un epítipo lineal secuencial o un epítipo conformacional. Los epítipos dentro de un polipéptido de la invención pueden ser identificados por varios métodos. Véase, por ejemplo, la Patente US 4.554.101; Jameson y Wolf, CABIOS 4:181-186 (1988). Por ejemplo, un polipéptido de la invención puede aislarse y examinarse. Una serie de péptidos cortos, que juntos abarcan toda la secuencia del polipéptido, se puede preparar por escisión proteolítica. Al comenzar con, por ejemplo, fragmentos de polipéptidos de 20-mer, cada fragmento se puede probar para la presencia de epítipos reconocidos en, por ejemplo, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). En un ensayo de ELISA de un polipéptido, tal como un fragmento de polipéptido de 20-mer, está unido a un soporte sólido, tales como los pocillos de una placa de múltiples pocillos de plástico. Una población de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos están etiquetados, añade al soporte sólido y permite que se una al antígeno no marcado, en condiciones en que se bloquea la adsorción no específica, y cualquier anticuerpo no unido y otras proteínas se elimina por lavado. Unión de los anticuerpos se detecta mediante, por ejemplo, una reacción que convierte un reactivo indicador incoloro en un producto de reacción coloreado. Progresivamente más pequeños y fragmentos solapantes a

continuación, se puede probar a partir de un 20-mer identificado para mapear el epítipo de interés.

5 Preferiblemente, un polipéptido de la invención se sintetiza utilizando sintetizadores de péptidos convencionales, que son bien conocidos en la técnica. Un polipéptido de la invención también puede ser producido recombinantemente. Un polinucleótido que codifica un polipéptido *A. phagocytophila* puede ser introducido en un vector de expresión que puede expresarse en un sistema de expresión adecuado usando técnicas bien conocidas en la técnica. Una variedad de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos, insectos y sistemas de expresión están disponibles en la técnica y cualquiera de tales sistemas de expresión puede ser utilizado. Opcionalmente, un polinucleótido que codifica un polipéptido *A. phagocytophila* puede ser traducido en un sistema de traducción libre de células.

10 Un polipéptido de la invención puede producirse como una proteína de fusión que contiene otras secuencias de aminoácidos, tales como enlazadores de aminoácidos o secuencias señal, así como ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina, y la proteína estafilocócica A. Más de un polipéptido de la invención puede estar presente en una proteína de fusión. El polipéptido puede ser fusionado al extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido de la invención.

15 Un polipéptido de la invención se pueden sintetizar de manera que comprende varios polipéptidos *A. phagocytophila* repetidos. Esto es un polipéptido multimérico. Estos polipéptidos repetidos pueden comprender un polipéptido específico, por ejemplo el polipéptido mostrado en la SEQ ID NO: 1, repetido 2 o más veces. Alternativamente, los polipéptidos repetidos pueden comprender una o más copias de un polipéptido *A. phagocytophila* mostrado en la SEQ ID NO: 1, junto con una o más copias de un polipéptido *A. phagocytophila* mostrado en la SEQ ID NO: 2 y/o SEQ ID NO: 3. Un polipéptido de la invención se pueden combinar o sintetizar con uno o más polipéptidos no-*A. phagocytophila*, fragmentos de polipéptidos o polipéptidos de longitud completa.

20 Un polipéptido de la invención se pueden combinar con un vehículo. Un portador es un vehículo para un polipéptido de la invención. Los vehículos incluyen, por ejemplo, excipientes, diluyentes, adyuvantes y estabilizadores. Ejemplos de tales estabilizadores son proteínas tales como albúminas séricas y gelatina; sacáridos tales como glucosa, sacarosa, lactosa, maltosa, trehalosa, sorbitol, maltitol, manitol y lactitol; tampones y que se componen principalmente de fosfato o succinato.

### 35 Polinucleótidos *A. phagocytophila*

Los polinucleótidos de la invención contienen menos de un genoma completo microbiana y pueden ser ARN o ADN de una sola o de doble hebra. Preferiblemente, los polinucleótidos se purifican libres de otros componentes, tales como proteínas y lípidos. Los polinucleótidos de la invención codifican los polipéptidos descritos anteriormente. Los polinucleótidos de la invención también pueden comprender otras secuencias de nucleótidos, tales como secuencias que codifican para engarces, secuencias señal, secuencias señal heterólogas, secuencias de parada de la transferencia TMR, dominios transmembrana, o ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina, y proteína estafilocócica A.

40 Los polinucleótidos pueden ser sintetizados en el laboratorio, por ejemplo, usando un sintetizador automático. Un método de amplificación tal como el PCR se puede utilizar para amplificar polinucleótidos de cualquiera de ADN genómico o ADNc que codifica los polipéptidos.

45 Si se desea, los polinucleótidos pueden ser clonados en un vector de expresión que comprende, por ejemplo, promotores, potenciadores, u otros elementos reguladores que dirigen la expresión de los polinucleótidos de la invención en células huésped. Un vector de expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido, tal como pBR322, pUC, o ColE1, o un vector de adenovirus, tal como un vector de tipo 2 o de tipo 5 vector de adenovirus.

50 Un vector que comprende un polinucleótido de la invención puede ser transformado en, por ejemplo, bacterianas, de levadura, de insecto o células de mamífero de modo que los polipéptidos de la invención pueden expresarse en y aislarse a partir de cultivo de células. Cualquiera de las técnicas que están disponibles en la técnica se puede utilizar para introducir polinucleótidos en las células huésped. Estos incluyen, pero no se limitan a, transfección con ácidos nucleicos desnudos o encapsulados, fusión celular, fusión de protoplastos, infección viral, y la electroporación.

55 Los polinucleótidos de la invención se pueden usar para producir polipéptidos de la invención y tal como, por ejemplo, como sondas o cebadores para detectar la presencia de polinucleótidos *A. phagocytophila* en una muestra, como una muestra biológica. La capacidad de tales sondas para hibridar específicamente a secuencias de polinucleótidos *A. phagocytophila* permitirá que sean de uso en la detección de la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada.

### 60 Métodos de detección

65 Los métodos de la invención se pueden usar para detectar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos específicos para *A. phagocytophila* en una muestra de ensayo, tal como una muestra biológica, una muestra ambiental o una muestra de laboratorio. Una muestra biológica puede incluir, por ejemplo, sueros, sangre, células, plasma o tejido de

un mamífero tal como un caballo, gato, perro o humano. La muestra de prueba puede estar sin tratar, precipitado, fraccionado, separada, diluida, concentrada, purificada o antes de combinar con un polipéptido de la invención.

5 Los métodos comprenden poner en contacto un polipéptido de la invención con una muestra de ensayo en condiciones que permitan formar un polipéptido/anticuerpo complejo. Es decir, un polipéptido de la invención se une específicamente a un anticuerpo específico para *A. phagocytophila* situado en la muestra. Se detecta en la muestra la formación de un complejo entre el polipéptido y los anticuerpos anti- *A. phagocytophila*. En una forma de realización de la invención, se detecta el complejo polipéptido/ anticuerpo cuando un reactivo indicador, tal como una enzima, que se une al anticuerpo, cataliza una reacción detectable. Opcionalmente, un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal puede ser aplicado al complejo polipéptido/anticuerpo en condiciones que permitan la formación de un complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Se detecta el complejo polipéptido/anticuerpo/indicador. Opcionalmente, el polipéptido o anticuerpo puede marcarse con un reactivo indicador antes de la formación de un complejo polipéptido/anticuerpo. El método puede comprender opcionalmente un control positivo o negativo.

10 Los ensayos de la invención incluyen, pero no se limitan a los basados en la competencia, reacción directa o ensayos de tipo sándwich. Los ensayos pueden usar fases sólidas o sustratos o se puede realizar mediante inmunoprecipitación o cualquier otro método que no utilizan fases sólidas. Cuando se usa una fase sólida o sustrato, un polipéptido de la invención está unido directa o indirectamente a un soporte sólido o un sustrato tal como un pocillo de microtitulación, perlas magnéticas, perlas no magnético, la columna, la matriz, la membrana, esterilla fibrosa compuesta de fibras sintéticas o naturales (por ejemplo, materiales, de vidrio o a base de celulosa o polímeros termoplásticos, tales como, polietileno, polipropileno, o de poliéster), la estructura sinterizada compuestas de materiales en partículas (por ejemplo, vidrio o diversos polímeros termoplásticos), o película de membrana compuesta de reparto nitrocelulosa, nailon, polisulfona o similares (generalmente sintética en naturaleza). Un sustrato preferido es sinterizado, finas partículas de polietileno, conocido comúnmente como polietileno poroso, por ejemplo, 10-15 micras de polietileno poroso de Chromex Corporation (Albuquerque, N. Mex.). Todos estos materiales de sustrato pueden usarse en formas adecuadas, tales como películas, láminas o placas, o pueden recubrirse sobre o unidos o laminados a vehículos inertes apropiados, tales como papel, vidrio, películas de plástico o tejidos. Los métodos adecuados para inmovilizar péptidos sobre fases sólidas incluyen iónicas, hidrofóbicas, interacciones covalentes y similares.

15 Los polipéptidos de la invención pueden ser utilizados para detectar en ensayos anticuerpos anti-*A. phagocytophila* o fragmentos de anticuerpos incluyendo, pero no limitado, a ensayos inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA), western blot, IFA, radioinmunoanálisis (RIA), hemaglutinación (HA), y el inmunoensayo de polarización de fluorescencia (FPIA). Un ensayo preferido de la invención es el ensayo de unión cromatográfico de flujo reversible, p. ej. un ensayo de SNAP®. Ver Patente US 5.726.010.

20 En un tipo de formato de ensayo, uno o más polipéptidos se puede recubrir sobre una fase sólida o sustrato. Una muestra de ensayo sospechosa de contener un anticuerpo anti-*A. phagocytophila* o fragmento del mismo se incuba con un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal conjugado a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo específico para *A. phagocytophila* durante un tiempo y bajo condiciones suficientes para formar complejos antígeno/anticuerpo de o bien anticuerpos de la muestra de ensayo a la polipéptidos de la fase sólida o el compuesto reactivo indicador conjugado con un anticuerpo específico para *A. phagocytophila* para los polipéptidos de la fase sólida. La reducción en la unión del reactivo indicador conjugado con un anticuerpo anti- *A. phagocytophila* para la fase sólida puede medirse cuantitativamente. Una reducción medible en la señal en comparación con la señal generada a partir de una muestra de ensayo *A. phagocytophila* negativa confirmada indica la presencia de anticuerpos anti-*A. phagocytophila* en la muestra de ensayo. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti- *A. phagocytophila* en una muestra de prueba.

25 En otro tipo de formato de ensayo, uno o más polipéptidos de la invención se recubren sobre un soporte o sustrato. Un polipéptido de la invención se conjuga con un reactivo indicador y se añade a una muestra de prueba. Esta mezcla se aplica al soporte o sustrato. Si anticuerpos *A. phagocytophila* están presentes en la muestra de prueba se unirán al polipéptido conjugado con un reactivo indicador y al polipéptido inmovilizado sobre el soporte. El complejo polipéptido/anticuerpo/indicador se puede detectar entonces. Este tipo de ensayo puede cuantificar la cantidad de anticuerpos anti-*A. phagocytophila* en una muestra de prueba.

30 La formación de un complejo polipéptido/anticuerpo o un complejo polipéptido/anticuerpo/indicador puede ser detectada por el tamaño de separación, o precipitación métodos radiométricos, colorimétricos, fluorométricos. Opcionalmente, la detección de un complejo polipéptido/anticuerpo es mediante la adición de un anticuerpo secundario que está acoplado a un reactivo indicador que comprende un compuesto generador de señal. Reactivos indicadores que comprenden compuestos de generación de señales (etiquetas) asociados a un complejo polipéptido/anticuerpo pueden ser detectados utilizando los métodos descritos anteriormente e incluyen agentes cromogénicos, catalizadores tales como enzimas, compuestos fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, compuestos quimioluminiscentes tales como dioxetanos, acridiniums, phenanthridiniums, rutenio y luminol, elementos radiactivos, marcadores visuales directos, así como cofactores, inhibidores, partículas magnéticas, y similares. Ejemplos de enzimas incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa, y

similares. La selección de un marcador particular no es crítica, pero será capaz de producir una señal por sí mismo o en combinación con una o más sustancias adicionales.

5 La formación del complejo es indicativa de la presencia de anticuerpos anti- *A. phagocytophila* en una muestra de prueba. Por lo tanto, los métodos de la invención se pueden utilizar para diagnosticar la infección por *A. phagocytophila* en un paciente.

10 Los métodos de la invención también pueden indicar la suma o cantidad de anticuerpos anti-*A. phagocytophila* en una muestra de prueba. Con muchos reactivos indicadores, tales como enzimas, la cantidad de anticuerpo presente es proporcional a la señal generada. Dependiendo del tipo de muestra de prueba, puede diluirse con un reactivo tampón adecuado, concentrada, o en contacto con una fase sólida sin ninguna manipulación. Por ejemplo, por lo general se prefiere probar muestras de suero o plasma que se han diluido previamente, o concentrar especímenes tales como orina, con el fin de determinar la presencia y/o cantidad de anticuerpo presente.

15 La invención comprende además kits de ensayo (por ejemplo, artículos de fabricación) para la detección de anticuerpos anti- *A. phagocytophila* o fragmentos de anticuerpos en una muestra. Un kit o artículo de fabricación que comprende uno o más polipéptidos de la invención y medios para determinar la unión del polipéptido a anticuerpos *A. phagocytophila* o fragmentos de anticuerpos en la muestra. Un kit puede comprender un dispositivo que contiene uno o más polipéptidos de la invención e instrucciones para el uso de los uno o más polipéptidos para la identificación de una infección por *A. phagocytophila* en un mamífero. El kit también puede comprender material de envasado que comprende una etiqueta que indica que los uno o más polipéptidos del kit se pueden utilizar para la identificación de la infección por *A. phagocytophila*. Otros componentes tales como tampones, controles y similares, conocidos por los expertos ordinarios en el arte, pueden ser incluidos en tales kits de prueba. Los polipéptidos, ensayos y kits de la invención son útiles, por ejemplo, en el diagnóstico de casos individuales de infección por *A. phagocytophila* en un paciente, así como los estudios epidemiológicos de brotes de *A. phagocytophila*.

20 Los polipéptidos y ensayos de la invención pueden combinarse con otros polipéptidos o ensayos para detectar la presencia de *A. phagocytophila* junto con otros organismos. Por ejemplo, los polipéptidos y ensayos de la invención pueden combinarse con reactivos que detectan *dirofilaria immitis* y/o *Borrelia burgdorferi*.

#### Anticuerpos monoclonales

35 Los polipéptidos de la invención también pueden usarse para desarrollar anticuerpos monoclonales y/o policlonales que se unen específicamente a un epítipo inmunológico de *A. phagocytophila* presente en los polipéptidos de la invención.

40 Los anticuerpos o fragmentos de los mismos pueden ser empleadas en sistemas de ensayo, tales como un ensayo de unión cromatográfico de flujo reversible, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, ensayo de western blot, o un ensayo de inmunofluorescencia indirecta, para determinar la presencia, en su caso, de polipéptidos o anticuerpos *A. phagocytophila* en una muestra de ensayo. Además, estos anticuerpos, en particular anticuerpos monoclonales, pueden unirse a matrices similares a Sepharose activada con CNBr y utilizados para la purificación por afinidad de proteínas específicas de *A. phagocytophila*, por ejemplo, cultivos celulares o suero de la sangre, como para purificar recombinante y nativas antígenos y proteínas de *A. phagocytophila*. Los anticuerpos monoclonales de la invención también se pueden utilizar para la generación de anticuerpos quiméricos para uso terapéutico u otras aplicaciones similares.

50 Los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítipos de *A. phagocytophila* pueden ser producidos por un experto en la técnica. La metodología general para producir tales anticuerpos es bien conocida y se ha descrito en, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256:494 (1975) y revisado en el JGR Hurrel, ed, monoclonales de hibridoma: Anticuerpos. Técnicas y Aplicaciones, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida (1982), así como se enseña en LT Mimms et al., *Virology* 176:604-619 (1990). Líneas celulares inmortales productoras de anticuerpos pueden ser creadas mediante fusión celular, y también por otras técnicas tales como la transformación directa de linfocitos B con ADN oncogénico, o la transfección con virus de Epstein-Barr.

55 A continuación se proporcionan sólo con fines de ejemplificación y no pretenden limitar el alcance de la invención antes descrita en términos generales. Todas las referencias citadas en esta descripción se incorporan en este documento por referencia.

#### **EJEMPLOS**

##### **Ejemplo 1: Canino**

65 Se obtuvieron tres anticuerpos positivos *A. phagocytophila* y tres muestras de anticuerpos negativos *A. phagocytophila* de control canino (confirmadas por Western blot) de la Estación Experimental Agrícola de Connecticut (New Haven, Connecticut). Las muestras positivas fueron suministrados con títulos anticuerpos *A.*

*phagocytophila* ELISA determinados por la Estación Experimental Agrícola de Connecticut utilizando un lisado de células enteras *A. phagocytophila* como fuente de antígeno.

Los títulos de *A. phagocytophila* ELISA y los resultados del inmunoanálisis basado en una placa de microtitulación se obtuvieron usando una mezcla (50:50) de los péptidos sintéticos que se muestran en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Los péptidos sintéticos de inmunoensayo fueron inmovilizados en pocillos de microtitulación. Una dilución de la muestra de ensayo se añadió al pocillo de microtitulación y el anticuerpo no-unido se eliminó mediante lavado. Se detectó, por reacción con un anti-especie, un anticuerpo unido al péptido inmovilizado, en este caso, canino, peroxidasa de rábano picante (HRPO), el lavado y adición de un sustrato HRPO. La densidad óptica de los pocillos de microtitulación individuales se determinó utilizando un lector de placas de microtitulación. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

#### **Ejemplo 2: Equino**

Se obtuvieron tres anticuerpos positivos *A. phagocytophila* y tres muestras de anticuerpos negativos *A. phagocytophila* de control canino (confirmadas por Western blot) de la Estación Experimental Agrícola de Connecticut. Las muestras positivas fueron suministrados con títulos anticuerpos *A. phagocytophila* ELISA determinados por la Estación Experimental Agrícola de Connecticut utilizando un lisado de células enteras *A. phagocytophila* como fuente de antígeno.

Los títulos de *A. phagocytophila* ELISA y los resultados del inmunoanálisis basado en una placa de microtitulación se obtuvieron usando una mezcla (50:50) de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. El ensayo basado en péptidos se realizó como se ha descrito anteriormente usando un anticuerpo anti-equino: HRPO conjugado. Los resultados se muestran en la Tabla 2.

#### **Ejemplo 3: Felino**

Se obtuvieron tres anticuerpos positivos *A. phagocytophila* y tres muestras de anticuerpos negativos *A. phagocytophila* de felino del Dr. Steve Levy, un veterinario de Connecticut. Las muestras fueron confirmadas por un ensayo de inmunofluorescencia (IFA) en la Universidad Estatal de Carolina del Norte utilizando un lisado de células enteras *A. phagocytophila* como fuente de antígeno.

Los títulos de *A. phagocytophila* determinados por IFA y los resultados del inmunoanálisis basado en una placa de microtitulación se obtuvieron usando una mezcla (50:50) de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. El ensayo basado en péptidos se realizó como se ha descrito anteriormente usando un anticuerpo anti-felino: HRPO conjugado. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

#### **Ejemplo 4: Canino (SEQ ID NO: 3)**

Se obtuvieron tres anticuerpos positivos *A. phagocytophila* y tres muestras de anticuerpos negativos *A. phagocytophila* de control canino, confirmadas por IFA, del Dr. Steve Levy.

Se determinaron los anticuerpos para SEQ ID NO: 3 por inmunoanálisis basado en una placa de microtitulación. Los péptidos sintéticos fueron inmovilizados en pocillos de microtitulación. Se añadió una dilución de la muestra de ensayo al pocillo de microtitulación y el anticuerpo no-unido fue eliminado mediante lavado. Se detectó, por reacción con un anti-especie, un anticuerpo unido al péptido inmovilizado, en este caso, canino, peroxidasa de rábano picante (HRPO), el lavado y adición de un sustrato HRPO. La densidad óptica de los pocillos de microtitulación individuales se determinó utilizando un lector de placas de microtitulación. Los resultados se muestran en la Tabla 4.

#### **Ejemplo 5: Equino (SEQ ID NO: 3)**

Se obtuvieron tres anticuerpos positivos *A. phagocytophila* y tres muestras de anticuerpos negativos *A. phagocytophila* de control equino confirmadas por IFA del Laboratorio de Diagnóstico Veterinario de Connecticut.

Se determinaron los anticuerpos para SEQ ID NO: 3 por inmunoanálisis basado en una placa de microtitulación El ensayo basado en péptidos se realizó como se ha descrito anteriormente usando un anticuerpo anti-equino: HRPO conjugado. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

#### **Ejemplo 6: Felino (SEQ ID NO: 3)**

Se obtuvieron tres anticuerpos positivos *A. phagocytophila* y tres muestras de anticuerpos negativos *A. phagocytophila* de felino, confirmadas por IFA, del Dr. Steve Levy.

Se determinaron los anticuerpos para SEQ ID NO: 3 por inmunoanálisis basado en una placa de microtitulación El ensayo basado en péptidos se realizó como se ha descrito anteriormente usando un anticuerpo anti-felino: HRPO conjugado. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 1. Comparación de los resultado de ELISA utilizando un lisado de células enteras *A. phagocytophila* como fuente de antígeno y péptidos sintéticos *A. phagocytophila*

Muestra ID	Especies	Título de <i>A. phagocytophila</i> ELISA/ Resultado <sup>1</sup>	Péptidos sintéticos de <i>A. phagocytophila</i> ELISA OD / Resultado
2249	Canina	2560 / Pos	0,068 / Pos
2185	Canina	20480 / Pos	0,504 / Pos
2292	Canina	10240 / Pos	0,342 / Pos
WY05	Canina	Neg	0,034 / Neg
WY023	Canina	Neg	0,036 / Neg
WY013	Canina	Neg	0,031 / Neg

<sup>1</sup> Estación Experimental Agrícola de Connecticut

Tabla 2. Comparación de los resultado de ELISA utilizando un lisado de células enteras *A. phagocytophila* como fuente de antígeno y péptidos sintéticos *A. phagocytophila*

Muestra ID	Especies	Título de <i>A. phagocytophila</i> ELISA/ Resultado <sup>1</sup>	Péptidos sintéticos de <i>A. phagocytophila</i> ELISA OD / Resultado
HO4a	Equina	40960 / Pos	0,261 / Pos
H46	Equina	5120 / Pos	0,048 / Pos
H22	Equina	20480 / Pos	0,362 / Pos
Kent 29	Equina	Neg	0,055 / Neg
Kent 26	Equina	Neg	0,056 / Neg
Kent 30	Equina	Neg	0,046 / Neg

<sup>1</sup> Estación Experimental Agrícola de Connecticut

Tabla 3. Comparación de los resultado de IFA utilizando un lisado de células enteras *A. phagocytophila* como fuente de antígeno y péptidos sintéticos *A. phagocytophila* usando ELISA

Muestra ID	Especies	Título de lisado de células enteras de <i>A. phagocytophila</i> IFA / Resultado <sup>2</sup>	Péptidos sintéticos de <i>A. phagocytophila</i> ELISA OD / Resultado
F8	Felina	2048 / Pos	0,678 / Pos
F15	Felina	2048 / Pos	0,848 / Pos
F19	Felina	64 / Pos	0,095 / Pos
F2	Felina	Neg	0,036 / Neg
F3	Felina	Neg	0,037 / Neg

<sup>2</sup> Universidad Estatal de Carolina del Norte

Tabla 4. Resultados de ELISA utilizando péptidos sintéticos de *A. phagocytophila*

Muestra ID	Especies	IFA <i>A. phagocytophila</i>	Péptidos sintéticos de <i>A. phagocytophila</i> SEQ ID NO: 3 ELISA OD / Resultado
DP87	Canina	Pos	0,742 / Pos
DP46	Canina	Pos	0,911 / Pos
DP20	Canina	Pos	1,157 / Pos
DP81	Canina	Neg	0,024 / Neg
DP88	Canina	Neg	0,006 / Neg
DP31	Canina	Neg	0,031 / Neg

Tabla 5. Resultados de ELISA utilizando péptidos sintéticos de *A. phagocytophila*

Muestra ID	Especies	IFA <i>A. phagocytophila</i>	Péptidos sintéticos de <i>A. phagocytophila</i> SEQ ID NO: 3 ELISA OD / Resultado
42	Equina	Pos	0,240 / Pos
535	Equina	Pos	0,355 / Pos
6	Equina	Pos	0,369 / Pos

98	Equina	Neg	0,041 / Neg
284	Equina	Neg	0,047 / Neg
315	Equina	Neg	0,048 / Neg

5

Tabla 6. Resultados de ELISA utilizando péptidos sintéticos de *A. phagocytophila*

Muestra ID	Especies	IFA <i>A. phagocytophila</i>	Péptidos sintéticos de <i>A. phagocytophila</i> SEQ ID NO: 3 ELISA OD / Resultado	
10	CP88	Felina	Pos	0,250 / Pos
	CP05	Felina	Pos	0,150 / Pos
	CP02	Felina	Pos	1,050 / Pos
	CP27	Felina	Neg	0,045 / Neg
15	CP42	Felina	Neg	0,043 / Neg

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> IDEXX Laboratories, Inc.  
 O'Connor, Thomas P.  
 Chandrashekar, Ramaswamy

<120> Péptidos para detectar anticuerpos A. phagocytophila

10 <130> MBHB 02-121-A

<160> 3

15 <170> Patent in version 3.2

<210> 1  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Anaplasma phagocytophila

20 <220>  
 <221> MISC FFATUIRF  
 <223> Péptido correspondiente al aminoácido 74 a 99

25 <400> 1

30 Lys Asp Gly Lys Ser Val Lys Leu Glu Ser His Lys Phe Asp Trp Asn  
 1 5 10 15

35 Thr Pro Asp Pro Arg Ile Gly Phe Lys Asp  
 20 25

40 <210> 2  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Anaplasma phagocytophila

45 <220>  
 <221> MISC FEATURE  
 <223> Péptido correspondiente al aminoácido 65 a 92

50 <400> 2

50 Glu Thr Lys Ala Val Tyr Pro Tyr Leu Lys Asp Gly Lys Ser Val Lys  
 1 5 10 15

55 Leu Glu Ser His Lys Phe Asp Trp Asn Thr Pro Asp  
 20 25

60 <210> 3  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Anaplasma phagocytophila

65 <220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> Péptido correspondiente al aminoácido 120 a 139

<400> 3

5           Leu Glu Ile Gly Tyr Glu Arg Phe Lys Thr Lys Gly Ile Arg Asp Ser  
          1                   5                           10                           15

10           Gly Ser Lys Glu  
                          20

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

**REIVINDICACIONES**

1. Un compuesto de materia que consiste en un polipéptido aislado como el mostrado en SEQ ID NO: 1.
- 5 2. El compuesto de la reivindicación 1, que comprende además un vehículo.
3. El compuesto de la reivindicación 1, en el que el polipéptido aislado es conjugado con albúmina de suero bovino.
- 10 4. Un polinucleótido aislado que codifica el polipéptido aislado de la reivindicación 1.
5. Un método de detección de anticuerpos específicos para *A. phagocytophila* que comprende: (a) contactar el polipéptido de SEQ ID NO: 1 con una muestra de ensayo sospechosa de comprender anticuerpos específicos para *A. phagocytophila*, en condiciones que permiten formar complejos polipéptidos/anticuerpos; y (b) detectar complejos polipéptidos/anticuerpos, en el que la detección de complejos polipéptidos/anticuerpos es una indicación de que los anticuerpos específicos para *A. phagocytophila* están presentes en la muestra de ensayo.
- 15 6. El método de la reivindicación 5, que además comprende el contacto de los complejos del paso (a) con un indicador reactivo que comprende un compuesto generador de señal con anterioridad a la realización del paso (b).
7. El método de la reivindicación 5, en el que los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos.
- 25 8. El método de la reivindicación 5, en el que se determina la cantidad de anticuerpo en la muestra de ensayo.
9. El método de la reivindicación 5, en el que el polipéptido de SEQ ID NO: 1 está unido a un sustrato.
- 30 10. El método de la reivindicación 5, en el que el polipéptido está en una forma multimérica.
11. El método de la reivindicación 5, en el que el polipéptido de SEQ ID NO: 1 se encuentra presente en una proteína de fusión que comprende los polipéptidos de SEQ ID NO: 1.
- 35 12. El método de la reivindicación 11, en el que el polipéptido está en una forma multimérica.
13. El método de la reivindicación 5, en el que la muestra de ensayo comprende una muestra biológica obtenida de un mamífero.
- 40 14. El método de la reivindicación 13, en el que el mamífero se selecciona del grupo compuesto por seres humanos, gatos, caballos y perros.
15. El método de la reivindicación 5, en el que el método comprende un ensayo seleccionado del grupo de ensayos consistentes en un ensayo de unión cromatográfico de flujo reversible, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas, un radioinmunoensayo, un ensayo de hemaglutinación, un ensayo de western blot, un inmunoensayo de polarización de fluorescencia y un ensayo de inmunofluorescencia indirecta.
- 45 16. Un artículo de fabricación que comprende material de envasado y, contenido dentro del material de envasado, un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1.
- 50 17. El artículo de fabricación de la reivindicación 16, en el que el material de envasado comprende una etiqueta que indica que uno o más polipéptidos pueden ser utilizados para la identificación de infección por *A. phagocytophila* en un mamífero.
- 55 18. El artículo de fabricación de la reivindicación 17, en el que la etiqueta de una infección por *A. phagocytophila* comprende un método de detección de anticuerpos específicos para *A. phagocytophila* que comprende: (a) contactar el polipéptido de SEQ ID NO: 1 con una muestra de ensayo sospechosa de comprender anticuerpos específicos para *A. phagocytophila*, en condiciones que permiten formar complejos polipéptidos/anticuerpos; y (b) detectar complejos polipéptidos/anticuerpos, en que la detección de complejos polipéptidos/anticuerpos es una indicación de que está presente una infección por *A. phagocytophila*.
- 60 19. Un método *in vitro* de diagnóstico de una infección por *A. phagocytophila* en un mamífero que comprende: (a) preparar una muestra biológica obtenida de un mamífero sospechoso de tener una infección por *A. phagocytophila*; (b) contactar el polipéptido de SEQ ID NO: 1 con la muestra biológica de (a) en condiciones que permitan formar complejos polipéptidos/anticuerpos; y (c) detectar complejos polipéptidos/anticuerpos; en que la detección de complejos polipéptidos/anticuerpos es una indicación de que el mamífero tiene una infección por *A. phagocytophila*.
- 65

20. El método de la reivindicación 19, que además comprende poner en contacto los complejos polipéptidos/ anticuerpos del paso (b) con un indicador reactivo que comprende un compuesto generador de señal que genera una señal medible con anterioridad a la realización del paso (c).
- 5 21. El método de la reivindicación 19, en el que el mamífero se selecciona del grupo compuesto por seres humanos, gatos, caballos y perros.
22. Un anticuerpo que se une específicamente a, por lo menos, un epítipo de un polipéptido de *A. phagocytophila*, en el que dicho polipéptido es SEQ ID NO: 1.
- 10 23. El anticuerpo de la reivindicación 22, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
24. Un método de detección de anticuerpos específicos para *A. phagocytophila* que comprende: (a) contactar una muestra de ensayo sospechosa de contener anticuerpos específicos para *A. phagocytophila* con el polipéptido de SEQ ID NO: 3 y el polipéptido de SEQ ID NO: 1, en el que el contacto se realiza en condiciones que permiten formar complejos polipéptidos/anticuerpos; y (b) detectar complejos polipéptidos/anticuerpos, en que la detección de complejos polipéptidos/ anticuerpos es una indicación de que anticuerpos específicos para *A. phagocytophila* están presentes en la muestra de ensayo.
- 15 25. El método de la reivindicación 24, que además comprende poner en contacto los complejos del paso (a) con un indicador reactivo que comprende un compuesto generador de señal con anterioridad a la realización del paso (b).
- 20 26. El método de la reivindicación 24, en el que los anticuerpos son fragmentos de anticuerpos.
- 25 27. El método de la reivindicación 24, en el que se determina la cantidad de anticuerpo en la muestra de ensayo.
28. El método de la reivindicación 24, en el que el polipéptido está en una forma multimérica.
- 30 29. El método de la reivindicación 24, en el que el polipéptido de SEQ ID NO: 3 y el polipéptido de SEQ ID NO: 1 es una proteína de fusión que comprende SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 1.
- 35 30. El método de la reivindicación 29, en el que al menos uno de los polipéptidos de la proteína de fusión está en una forma multimérica.
31. Una variante conservadora de un polipéptido mostrado en SEQ ID NO: 1.