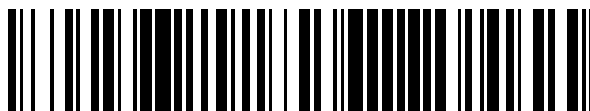


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 439 587**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008 E 08779117 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2013 EP 2170954**

54 Título: **Métodos de selección de animales resistentes a huéspedes**

30 Prioridad:

13.06.2007 NZ 55584707

06.05.2008 NZ 56801708

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2014

73 Titular/es:

**OVITA LIMITED (100.0%)
LEVEL 4, NZI HOUSE, 9 MORAY PLACE
DUNEDIN, NZ**

72 Inventor/es:

**SHAW, RICHARD JOHN;
CANNON, MERIE CHRISTINE;
ROSANOWSKI, SARAH MARGARET;
WHEELER, MARY y
MORRIS, CHRISTOPHER ANTHONY**

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 439 587 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

Métodos de selección de animales resistentes a huéspedes

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un método de selección de animales que son resistentes a parásitos, y a una prueba de diagnóstico para detectar la resistencia a parásitos en animales. En particular, la prueba de diagnóstico se basa en la detección de anticuerpos frente a antígenos de parásitos en fluido mucoso del animal. Específicamente, aunque en absoluto de manera exclusiva, la invención se refiere a la selección de ovejas y bovinos que son resistentes a infección por gusano nematodo.

Ninguna afirmación en esta memoria descriptiva debería interpretarse como que se refiere a un procedimiento biológico esencial, en particular a un procedimiento que implicara una etapa de cruzar y seleccionar animales.

Antecedentes de la invención

Los parásitos internos, y especialmente la infección por gusano nematodo, es uno de los mayores problemas de salud en granjas de ovejas y bovinos en todo el mundo. Tales parásitos internos provocan costosas reducciones en la producción del animal y, si no se tratan, la muerte del animal.

Tradicionalmente, las infecciones por parásito se tratan con agentes antihelmínticos. Hay tres familias de productos químicos a partir de los cuales se formulan todos los agentes antihelmínticos, que incluyen (1) los bencimidazoles; (2) levamisol y morantel; y (3) ivermectina. La eficacia de estos compuestos se ha reducido ya que se desarrolla resistencia en los parásitos. De hecho, recientes encuestas financiadas por la industria en Nueva Zelanda han encontrado que el 64% de las granjas de ovejas y el 94% de las granjas de terneros tienen ahora parásitos que son resistentes a al menos una de las tres clases de antihelmínticos. Se estima que tal resistencia cuesta a la industria de ovejas en Nueva Zelanda más de veinte millones de dólares al año en pérdidas de productividad (principalmente mediante resistencia no detectada) y aumento de los gastos (forzándose a los granjeros a usar productos de gran dosis caros).

No ha habido nuevas clases de antihelmínticos desde hace algún tiempo, y no es probable que se haga disponible una nueva clase en el futuro inmediato que sea rentable para el tratamiento de infecciones por nematodo a menos que se haya producido resistencia a las tres familias de antihelmínticos.

Se han propuesto métodos alternativos de control del efecto de infecciones por parásito en la granja, e incluyen tratamiento de pasto alterado, uso de hongos que atrapan nematodos, complementos dietéticos, vacunas y la cría selectiva de animales para obtener resistencia a huéspedes.

La selección de ovejas y bovinos que son resistentes de manera natural a nematodos intestinales ha sido satisfactoria en varias especies en Nueva Zelanda, Australia e Irlanda. Tal selección se logra actualmente usando un recuento de huevos en heces (FEC). Este método es costoso y requiere mucho trabajo, y requiere exponer los animales a una exposición a parásitos razonable durante aproximadamente de seis a ocho semanas tras el destete. Se usa el promedio de dos recuentos de huevos tomados a lo largo de este período de seis a ocho semanas para evaluar la resistencia a parásitos de cada animal. También se ha estimado que se requieren al menos ocho años de selección antes de obtener FEC sistemáticamente bajos.

Otros métodos para seleccionar animales que son resistentes a huéspedes incluyen métodos de selección de animales que muestran altos niveles de inmunidad natural frente a los parásitos. Algunos estudios con ovejas han mostrado que esta inmunidad está correlacionada con FEC reducido y puede realizarse mediante anticuerpos (IgG1, IgE, IgA), eosinófilos, mastocitos, células calciformes, secreción de fluidos y electrolitos, aumento de la actividad del músculo liso y aumento de la renovación de células epiteliales. Sin embargo, no se ha mostrado que todas estas respuestas inmunitarias sean eficaces en la prevención del establecimiento de larvas o la expulsión de nematodos adultos.

El documento WO 03/064475 da a conocer un posible marcador de resistencia inmunitaria que puede usarse para seleccionar animales con niveles aumentados de resistencia genética. En particular, se mostró que las ovejas resistentes de manera natural producían anticuerpos frente a un antígeno presente en las larvas en tercera fase de nematodos parásitos. Este antígeno consiste en una cubierta protectora de hidratos de carbono (CarLA). Se han detectado anticuerpos frente a CarLA en la mucosa intestinal. Se ha mostrado que el nivel de anticuerpos en la mucosa intestinal está correlacionado con un FEC reducido y previene el establecimiento de larvas (Harrison *et al*, 2003). Sin embargo, obviamente la toma de muestras de mucosa en animales de prueba para detectar la resistencia a huéspedes no es práctica.

El documento WO 03/064475 da a conocer una prueba de diagnóstico que mide la presencia de un anticuerpo frente

a CarLA o del antígeno CarLA en sí mismo en una muestra de sangre. Sin embargo, en esta memoria descriptiva no se mostró como ejemplo una prueba de este tipo, de modo que no queda claro si los anticuerpos frente a CarLA o el antígeno CarLA pueden detectarse en la sangre, o aunque puedan detectarse, si tales niveles de anticuerpo o antígeno en la sangre se correlacionan o no con la resistencia a huéspedes.

Además, aunque el análisis de sangre descrito en el documento WO 03/064475 fuera útil para seleccionar animales resistentes, un análisis de sangre de este tipo requeriría mucho trabajo y sería costoso ya que se requeriría someter a prueba las muestras en laboratorios profesionales. Además, los granjeros serían reacios a usar una prueba invasiva de este tipo.

Sería deseable una prueba más sencilla que requiriera una recogida de muestras fácil, de modo que requiriera menos trabajo, y fuera menos cara, proporcionara resultados más rápido y fuera práctica para su uso en la granja.

Un objeto de la presente invención es avanzar hacia la obtención de este deseo y/o proporcionar al público una opción útil.

Explicación de la invención

En su sentido más amplio, la invención se refiere al objeto definido en las reivindicaciones adjuntas.

1. Método de selección de ungulados que son genéticamente resistentes a infecciones por uno o más gusanos nematodos, comprendiendo dicho método las etapas:

(a) obtener una muestra de mucosa de dicho ungulado;

(b) someter a prueba la muestra para detectar la presencia de un anticuerpo contra el antígeno de cubierta protectora de hidratos de carbono (CarLA) presente en la tercera fase larvaria (L3) de dicho uno o más gusanos nematodos; y

(c) separar y seleccionar ungulados que tienen un resultado positivo para el anticuerpo en la etapa (b) en el que la muestra de mucosa comprende fluido mucoso de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina.

2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra de mucosa comprende saliva.

3. Método según la reivindicación 1, en el que el uno o más gusanos nematodos se seleccionan del grupo que consiste en *Trichostrongylus colubriformis*, *Haemonchus contortus*, *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta*, *Cooperia curticei*, *Nematodirus spathiger*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*, *Nematodirus brasiliensis* y *Dictyocaulus eckerti*.

4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo comprende anticuerpo monoclonal AcM PAB-1 (n.º de registro de ATCC PTA-4005), que se une específicamente al antígeno de superficie CarLA en L3 de nematodo.

5. Método para detectar la presencia de anticuerpos que son específicos para un antígeno de superficie CarLA de L3 presente en una o más especies de gusanos nematodos en una muestra de mucosa de un ungulado, comprendiendo dicho método las etapas:

(a) obtener una muestra de mucosa de dicho ungulado que comprende fluido mucoso de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina;

(b) poner en contacto dicha muestra con el antígeno de superficie CarLA de L3, formando así un complejo anticuerpo/antígeno; y

(c) detectar la presencia o ausencia del complejo;

en el que la presencia de dicho complejo anticuerpo/antígeno es indicativa de un ungulado que es genéticamente resistente a infección por gusano nematodo.

6. Método según la reivindicación 5, en el que la muestra de mucosa es saliva.

7. Método según la reivindicación 5 ó 6, en el que el antígeno se selecciona de uno o más antígenos CarLA de L3 de nematodo seleccionados del grupo que consiste en:

(a) un antígeno de superficie en *C. curticei* que corre a sustancialmente 46 kDa y a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(b) un antígeno de superficie en *N. spathiger* que corre a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

5 (c) un antígeno de superficie en *H. contortus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; y

(d) un antígeno de superficie en *O. circumcincta* que corre a sustancialmente 35-39 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

10 (e) un antígeno de superficie en *T. axei* o *T. vitrinus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

15 (f) un antígeno de superficie en *O. ostertagi* que corre a sustancialmente 30-45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(g) un antígeno de superficie en *C. oncophora* que corre a sustancialmente 20 kDa y a sustancialmente 48 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

20 (h) un antígeno de superficie en *N. brasiliensis* que corre a sustancialmente 9 kDa y a sustancialmente 12 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; y

(i) un antígeno de superficie en *D. eckerti* que corre a sustancialmente 30 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras.

25 8. Método según la reivindicación 7, en el que el antígeno está inmovilizado sobre una superficie sólida y el complejo se detecta usando un marcador en el antígeno que es detectable cuando se forma el complejo.

30 9. Método según la reivindicación 8, en el que el complejo se detecta usando un segundo anticuerpo marcado que se une al complejo.

10. Método según la reivindicación 8 ó 9, en el que la detección se lleva a cabo usando una tira reactiva que comprende uno o más antígenos inmovilizados.

35 11. Kit para detectar la presencia de un anticuerpo específico para uno o más antígenos de superficie CarLA de L3 de nematodo, comprendiendo dicho kit:

(a) un recipiente para una muestra de mucosa;

40 (b) un reactivo que comprende uno o más antígenos CarLA de L3 de nematodo marcados; y

(c) unos medios de recogida de muestras de mucosa;

en el que la muestra de mucosa se selecciona de una muestra de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina.

45 12. Kit según la reivindicación 11, que comprende:

(d) una tira reactiva que comprende uno o más antígenos CarLA de L3 de nematodo inmovilizados; y

50 (e) un reactivo que comprende un segundo anticuerpo marcado.

13. Kit según la reivindicación 11 ó 12, en el que el recipiente de muestra es para saliva.

14. Kit según la reivindicación 11 ó 12, en el que los medios de recogida son para recoger saliva.

55 15. Kit según la reivindicación 11, que comprende además instrucciones de uso.

16. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende además medios de detección para detectar uno o más antígenos marcados.

60 17. Kit según la reivindicación 12, que comprende además medios de detección para detectar un segundo anticuerpo marcado.

18. Método de diagnóstico de infección por nematodo en un animal ungulado que comprende las etapas:

65

(a) obtener una muestra de mucosa del ungulado; y

(b) analizar la muestra para detectar la presencia de un anticuerpo contra uno o más antígenos CarLA de L3 de nematodo, en el que la muestra de mucosa se selecciona de una muestra de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina.

19. Método de determinación de la resistencia a nematodos en un ungulado sometiendo a ensayo una muestra de mucosa del ungulado para detectar la presencia de un anticuerpo específico para uno o más antígenos CarLA de L3, que comprende poner en contacto la muestra con uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en:

(a) un antígeno de superficie en *C. curticei* que corre a sustancialmente 46 kDa y a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(b) un antígeno de superficie en *N. spathiger* que corre a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(c) un antígeno de superficie en *H. contortus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; y

(d) un antígeno de superficie en *O. circumcincta* que corre a sustancialmente 35-39 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(e) un antígeno de superficie en *T. axei* o *T. vitrinus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(f) un antígeno de superficie en *O. ostertagi* que corre a sustancialmente 30-45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(g) un antígeno de superficie en *C. oncophora* que corre a sustancialmente 20 kDa y a sustancialmente 45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(h) un antígeno de superficie en *N. brasiliensis* que corre a sustancialmente 9 kDa y a sustancialmente 12 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; y

(i) un antígeno de superficie en *D. eckerti* que corre a sustancialmente 30 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras,

y medir la presencia o ausencia de complejo anticuerpo/antígeno en la muestra, mediante lo cual la presencia del complejo es indicativa de resistencia a nematodos en el ungulado, y en el que la muestra de mucosa se selecciona de una muestra de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina.

20. Método de diagnóstico de infección por nematodo según la reivindicación 18, o método de determinación de la resistencia a nematodos según la reivindicación 19, en el que la muestra de mucosa es saliva.

Breve descripción de los dibujos

Ahora se describirá la invención en más detalle con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

la figura 1 muestra una configuración de toma de muestras de saliva preferida para su uso en la invención;

la figura 2 muestra gusanos nematodos marcados para mostrar la presencia de CarLA en la superficie de larvas;

la figura 3 muestra la respuesta de anticuerpos contra CarLA en ovejas en comparación con FEC;

la figura 4 muestra la respuesta de anticuerpos contra CarLA en rebaños Highlander y Coopworth a lo largo de 24 semanas de pastoreo en el pasto infectado por nematodos (la flecha horizontal muestra el mejor momento para tomar muestras de saliva; y la flecha vertical muestra el tiempo en el que se pusieron ovejas hembra Highlander en pasto "limpio"); y

la figura 5 muestra una configuración de centrifugación de saliva mejorada.

Descripción detallada

La presente invención proporciona una prueba eficaz sencilla para determinar la resistencia a parásitos intestinales en animales ungulados.

La prueba utiliza mucosa como muestra de prueba biológica por primera vez. La muestra de mucosa puede comprender una muestra de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina del animal. Preferiblemente, la muestra es saliva.

La mucosa no es una muestra de prueba biológica común para detectar la presencia de anticuerpos ya que plantea numerosos problemas. Un problema es que la mucosa es viscosa y difícil de manipular y generalmente requiere dilución. Dado que los anticuerpos presentes en la mucosa, y en particular en la saliva, habitualmente se originan en el suero, ya están presentes a bajas concentraciones y, tras la dilución, pueden no ser detectables. Además, la mucosa también contiene numerosas enzimas, tales como proteasas, que pueden digerir cualquier anticuerpo presente en la muestra, haciendo que la detección sea incluso más difícil.

La presente invención muestra por primera vez que pueden detectarse anticuerpos específicos contra antígenos de cubierta de superficie de L3 de nematodo en la saliva de animales resistentes, y además que, sorprendentemente, las respuestas de anticuerpos en saliva positivas son mejores factores pronóstico de la resistencia a parásitos en ovejas que los anticuerpos medidos en el suero.

La recogida de saliva no es invasiva y puede realizarse por personal sin formación, al contrario que la extracción de sangre. La recogida de saliva puede llevarse a cabo por una única persona y es altamente eficaz (20-25 segundos por animal) y es más probable que se realice en la granja que la más compleja extracción de muestras de sangre. Por tanto, la presente invención ofrece numerosas ventajas con respecto a métodos de toma de muestras y de prueba conocidos.

Se espera que los anticuerpos específicos contra antígenos de cubierta de superficie de L3 de nematodo podrán detectarse en otras muestras de mucosa distintas de saliva de animales resistentes, tales como en secreciones de fluido de la nariz, garganta, cavidad rectal y vagina. Un experto puede obtener fácilmente tales muestras y someterlas a prueba para detectar la presencia de antígenos de L3 para determinar la resistencia a parásitos según el método de la presente invención.

Un método de selección de ungulados que son genéticamente resistentes a infecciones por uno o más gusanos nematodos, comprendiendo dicho método las etapas:
obtener una muestra de mucosa de dicho ungulado;
someter a prueba la muestra para detectar la presencia de un anticuerpo contra el antígeno de cubierta protectora de hidratos de carbono (CarLA) presente en la tercera fase larvaria (L3) de dicho uno o más gusanos nematodos; y
separar y seleccionar ungulados que tienen un resultado positivo para el anticuerpo en la etapa (b),
en el que la muestra de mucosa comprende fluido mucoso de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina.

Preferiblemente la muestra es saliva.

La presencia del anticuerpo en la muestra es indicativa de un ungulado que es genéticamente resistente a infecciones por gusano nematodo.

Los ungulados que no son positivos son animales que son menos resistentes a gusanos nematodos. Estos animales tienen poco valor económico. Ese valor puede aumentarse sometiendo estos animales a un régimen de grandes dosis diferencial, regímenes de tratamiento de parásitos o pueden sacrificarse.

El término "que comprende" tal como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones significa "que consiste al menos en parte en", es decir que cuando se interpretan afirmaciones en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que incluyen ese término, todas las características, precedidas por ese término en cada afirmación, necesitan estar presentes pero también pueden estar presentes otras características.

La muestra de saliva puede obtenerse tomando un hisopo del interior de la mejilla del animal. Por ejemplo, esto puede lograrse colocando un rodillo de algodón dental, sujeto entre pinzas, entre el interior de la mejilla y la mandíbula y masajeando suavemente el interior de la mejilla del animal durante aproximadamente 7-15 segundos.

Entonces puede colocarse el hisopo que contiene la muestra de saliva dentro de un recipiente de muestra que está etiquetado apropiadamente de modo que puede rastrearse de vuelta hasta el animal específico. El recipiente de muestra puede contener un conservante, o puede congelarse o liofilizarse la muestra para evitar que se deteriore la muestra debido a la degradación por enzimas y/o bacterias presentes en la saliva.

Por ejemplo, la figura 1 muestra una configuración de toma de muestras de saliva preferida mediante la cual se colocan rodillos de algodón (1), sujetos entre pinzas (2), dentro de viales con códigos de barras (3) una vez que se ha tomado la muestra de saliva del animal. El código de barras en el vial se lee usando un lector de códigos de barras (4) y la etiqueta de identidad del animal se lee usando un lector de EID (5). La EID y el código de barras se hacen corresponder en un registrador de datos tal como un sistema Tru-Test XR3000 o cualquier otro sistema de

asistente digital personal (PDA) (6).

Se recoge la saliva mediante centrifugación del rodillo de algodón en un dispositivo adecuado que permite la separación de saliva del rodillo de algodón y se diluye la saliva en una disolución de tampón que contiene un conservante. Entonces se somete a ensayo la saliva diluida en palcas recubiertas con antígeno de cubierta de superficie de parásito intestinal purificado y generalmente se detecta el anticuerpo unido como una reacción de color mediante lo cual el antígeno está marcado con un marcador con color; o mediante lo cual se hace reaccionar un segundo anticuerpo marcado con un complejo anticuerpo/antígeno no marcado (ELISA). El valor de absorbancia es cuantitativo y representa la cantidad de anticuerpo presente en la saliva. La absorbancia por encima de un valor de corte predeterminado es un resultado positivo. El valor de absorbancia puede convertirse en un valor de cría.

El animal que va a someterse a prueba es un ungulado incluyendo una oveja, bovino, cerdo, cabra, ciervo o caballo.

Preferiblemente el ungulado es una oveja o bovino y más preferiblemente, el ungulado es una oveja. La infección por parásito intestinal está provocada por gusanos nematodos incluyendo *Trichostrongylus colubriformis*, *Haemonchus contortus*, *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta*, *Cooperia curticei*, *Nematodirus spathiger*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*, *Nematodirus brasiliensis* y *Dictyocaulus eckerti*.

El anticuerpo es específico para antígeno de superficie CarLA presente en la tercera fase larvaria (L3) del gusano.

“Anticuerpo” se refiere a una molécula de inmunoglobulina que puede unirse a un epítipo específico en un antígeno. Los anticuerpos pueden ser una mezcla policlonal o monoclonales. Los anticuerpos pueden ser inmunoglobulinas intactas derivadas de fuentes naturales o de fuentes recombinantes y pueden ser porciones inmunorreactivas de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden existir en una variedad de formas incluyendo, por ejemplo, Fv, Fab y F(ab).sub.2, así como en cadenas sencillas. También pueden usarse anticuerpos de cadena sencilla, en los que se combinan en una única secuencia codificante genes para una cadena pesada y una cadena ligera.

El término “L3” se refiere a una fase larvaria particular de desarrollo en el ciclo de vida de un nematodo. El ciclo de vida básico consiste en siete fases, un huevo, cuatro fases larvarias (L1-L4) y dos fases adultas. La fase larvaria debe avanzar a L3 antes de que pueda infectar a otro huésped. Los nematodos mudan cuatro veces durante cada ciclo de vida separando cada una de las fases larvarias y la fase larvaria de la fase adulta inicial. En la presente invención se aprovecha este proceso de muda para seleccionar como diana anticuerpos que se unen a antígenos de superficie presentes en el nematodo en L3.

El antígeno de superficie es la cubierta protectora de hidratos de carbono (CarLA) presente en L3 de nematodo. Esta cubierta de superficie se cambia de 4 a 7 días tras la infección del huésped. Los animales que son resistentes a nematodos producen anticuerpos frente a CarLA. La figura 2 muestra gusanos nematodos en L3 que se han marcado para mostrar CarLA en la superficie de la larva.

El anticuerpo que va a detectarse puede comprender anticuerpo monoclonal AcM PAB-1 depositado en la ATCC el 24 de enero de 2002, con el registro asignado PTA-4005, que se une específicamente a antígeno de superficie CarLA o L3 de nematodo.

Tal como se describió anteriormente, el anticuerpo puede detectarse usando un ensayo ELISA, o mediante cualquier otro método de detección adecuado tal como inmunotransferencia, inmunotransferencia de tipo Western, transferencia puntual, aglutinación, RIA y similares.

Para una revisión de procedimientos inmunológicos y de inmunoensayo en general, véase Basic and Clinical Immunology, 7ª edición (D. Stite and A. Terr ed.) 1991. Los inmunoensayos de la presente invención pueden realizarse en cualquiera de varias configuraciones, que se revisan extensamente en Enzyme Immunoassay, E.T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Fla, (1980); “Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P. Tijssen, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam (1985). Por ejemplo, los anticuerpos y antígenos dados a conocer en el presente documento se usan de manera conveniente en ensayos ELISA, de análisis por inmunotransferencia y de aglutinación.

En resumen, los inmunoensayos para medir anticuerpos anti-CarLA pueden ser ensayos de unión, competitiva o bien no competitiva. En ensayos de unión competitiva, el analito de muestra (por ejemplo, anticuerpos anti-CarLA) compite con un analito marcado (por ejemplo, anticuerpo monoclonal anti-CarLA) por sitios de unión específica en un agente de captura (por ejemplo, antígeno CarLA aislado) unido a una superficie sólida. La concentración de analito marcado unido al agente de captura es inversamente proporcional a la cantidad de analito libre presente en la muestra.

Los ensayos no competitivos son normalmente ensayos de tipo sándwich, en los que el analito de muestra está unido entre dos reactivos de unión específica a analito. Uno de los agentes de unión se usa como agente de captura

y está unido a una superficie sólida. El segundo agente de unión está marcado y se usa para medir o detectar el complejo resultante mediante medios visuales o instrumentales.

5 Pueden usarse varias combinaciones de agente de captura y agente de unión marcado. Por ejemplo, puede usarse un antígeno CarLA aislado como agente de captura y pueden usarse anticuerpos anti-CarLA marcados específicos para la región constante de anticuerpos contra CarLA como agente de unión marcado. Alternativamente, los anticuerpos anti-CarLA pueden ser el agente de captura y el antígeno puede estar marcado.

10 Diversos componentes del ensayo, incluyendo el antígeno y el anticuerpo anti-CarLA, pueden estar unidos a una superficie sólida. En la técnica se conocen muchos métodos para inmovilizar biomoléculas a una variedad de superficies sólidas. Por ejemplo, la superficie sólida puede ser una membrana (por ejemplo, nitrocelulosa), una placa de microtitulación (por ejemplo, de PVC o de poliestireno) o una perla. El componente deseado puede unirse de manera covalente o fijarse de manera no covalente mediante unión no específica.

15 Alternativamente, el inmunoensayo puede llevarse a cabo en fase líquida y puede emplearse una variedad de métodos de separación para separar el componente marcado unido de los componentes marcados no unidos. Estos métodos los conocen los expertos en la técnica e incluyen inmunoprecipitación, cromatografía en columna, adsorción, adición de partículas magnetizables recubiertas con un agente de unión y otros procedimientos similares.

20 También puede llevarse a cabo un inmunoensayo en fase líquida sin un procedimiento de separación. Ahora están aplicándose diversos métodos de inmunoensayo homogéneos para inmunoensayos para detectar analitos de proteínas. En estos métodos, la unión del agente de unión al analito provoca un cambio en la señal emitida por el marcador, de modo que puede medirse la unión sin separar el componente marcado unido del no unido.

25 También puede usarse análisis por inmunotransferencia de tipo Western (inmunotransferencia) para detectar la presencia de anticuerpos frente a CarLA en la muestra. Esta técnica es un método fiable para confirmar la presencia de anticuerpos contra un antígeno particular en la muestra. La técnica comprende generalmente separar antígenos mediante electroforesis en gel basándose en el peso molecular, transferir los antígenos separados a un soporte sólido adecuado (tal como un filtro de nitrocelulosa, un filtro de nailon o filtro de nailon derivatizado) e incubar la muestra con los antígenos separados. Esto provoca que anticuerpos diana específicos presentes en la muestra se unan a sus antígenos respectivos. Entonces se detectan los anticuerpos diana usando anticuerpos frente a CarLA marcados.

35 Los formatos de inmunoensayo descritos anteriormente emplean componentes de ensayo marcados. El marcador puede estar en una variedad de formas. El marcador puede estar acoplado directa o indirectamente al componente deseado del ensayo según métodos bien conocidos en la técnica. Puede usarse una amplia variedad de marcadores. El componente puede marcarse mediante uno cualquiera de varios métodos. Tradicionalmente se usaba un marcador radiactivo que incorporaba ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P . Los marcadores no radiactivos incluyen ligandos que se unen a anticuerpos marcados, fluoróforos, agentes quimioluminiscentes, enzimas y anticuerpos que pueden servir como miembros de pareja de unión específica para un ligando marcado. La elección del marcador depende de la sensibilidad requerida, la facilidad de conjugación con el compuesto, los requerimientos de estabilidad y la instrumentación disponible.

45 Las enzimas de interés como marcadores serán principalmente hidrolasas, particularmente fosfatasas, esterasas y glicosidasas u oxidoreductasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes incluyen fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Los compuestos quimioluminiscentes incluyen luciferina y 2-3-dihidroftalazindionas, por ejemplo Luminal. Para una revisión de diversos sistemas de marcaje o producción de señales que pueden usarse, véase la patente estadounidense n.º 4,391,904.

50 Los marcadores no radiactivos se fijan con frecuencia mediante medios indirectos. Generalmente, se une de manera covalente una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) a la molécula. Entonces se une el ligando a una molécula anti-ligando (por ejemplo, estreptavidina) que o bien puede detectarse inherentemente o bien está unida de manera covalente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente. Pueden usarse varios ligandos y moléculas anti-ligando. Cuando un ligando tiene una molécula anti-ligando natural, por ejemplo, biotina, tiroxina y cortisol, puede usarse junto con las moléculas anti-ligando que se producen de manera natural, marcadas. Alternativamente, puede usarse cualquier compuesto hapténico o antigénico en combinación con un anticuerpo. Alternativamente pueden usarse partículas de oro en las que se han adsorbido anticuerpos tal como apreciará un experto.

60 Algunos formatos de ensayo no requieren el uso de componentes marcados. Por ejemplo, pueden usarse ensayos de aglutinación para detectar la presencia de los anticuerpos diana. En este caso, se aglutinan partículas recubiertas con antígeno mediante muestras que comprenden los anticuerpos diana. En este formato, no se necesita que ninguno de los componentes esté marcado y la presencia del anticuerpo diana se detecta mediante inspección visual sencilla.

65

La invención proporciona además un método para detectar la presencia de anticuerpos que son específicos para un antígeno de superficie CarLA de L3 presente en gusanos nematodos en una muestra de mucosa de un ungulado, comprendiendo dicho método las etapas:

- 5 (a) obtener una muestra de mucosa, de dicho ungulado, que comprende fluido mucoso de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina;
 - (b) poner en contacto la muestra con el antígeno de superficie CarLA de L3, formando así un complejo anticuerpo/antígeno; y
 - 10 (c) detectar la presencia o ausencia del complejo;
- mediante lo cual la presencia de dichos anticuerpos es indicativa de un ungulado que es genéticamente resistente a infección por gusano nematodo.
- 15 El antígeno puede comprender uno o más antígenos de superficie en L3 de nematodo seleccionados del grupo que consiste en:
 - (a) un antígeno de superficie en *C. curticei* que corre a sustancialmente 46 kDa y a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - 20 (b) un antígeno de superficie en *N. spathiger* que corre a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - 25 (c) un antígeno de superficie en *H. contortus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; y
 - (d) un antígeno de superficie en *O. circumcincta* que corre a sustancialmente 35-39 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - 30 (e) un antígeno de superficie en *T. axei* o *T. vitrinus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - (f) un antígeno de superficie en *O. ostertagi* que corre a sustancialmente 30-45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - 35 (g) un antígeno de superficie en *C. oncophora* que corre a sustancialmente 20 kDa y a sustancialmente 45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - 40 (h) un antígeno de superficie en *N. brasiliensis* que corre a sustancialmente 9 kDa y a sustancialmente 12 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; e
 - (i) un antígeno de superficie en *D. eckerti* que corre a sustancialmente 30 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras.
 - 45 El antígeno puede estar inmovilizado sobre una superficie sólida y el complejo se detecta usando un marcador en el antígeno que puede detectarse cuando se forma el complejo. Alternativamente, el complejo puede detectarse usando un segundo anticuerpo marcado que se une al complejo.
 - 50 La detección se lleva a cabo preferiblemente usando una tira reactiva que comprende antígeno inmovilizado. Se pone la tira reactiva en contacto con la muestra y el complejo antígeno/anticuerpo se forma si el anticuerpo está presente en la muestra. Cuando el antígeno está marcado, el marcador se vuelve detectable tras formarse el complejo. Puede requerirse una etapa adicional para eliminar el exceso de muestra.
 - 55 Alternativamente, puede añadirse un reactivo que comprende un segundo anticuerpo marcado a la tira reactiva y se induce un cambio detectable si el segundo anticuerpo marcado se une al complejo. Un cambio detectable indica la presencia del anticuerpo en la muestra que está asociado con resistencia a parásitos en el animal.
 - 60 La muestra es preferiblemente saliva y puede recogerse tal como se describió anteriormente antes de ponerse en contacto con la tira reactiva, por ejemplo, sumergiendo la tira reactiva en una muestra de saliva diluida. Alternativamente, la tira reactiva puede modificarse de alguna manera de modo que puede usarse en lugar del rodillo de algodón para recoger saliva directamente de la cavidad oral del animal.
 - 65 Un resultado positivo es indicativo de un animal que muestra resistencia a huéspedes frente a parásitos intestinales.

También se describe una tira reactiva que comprende uno o más de los antígenos de superficie de L3 de nematodo mencionados anteriormente inmovilizados en la misma.

La presente invención también proporciona un kit para detectar la presencia de un anticuerpo específico para un antígeno de superficie CarLA de L3 de nematodo, comprendiendo dicho kit:

(a) un recipiente para una muestra de mucosa;

(b) un reactivo que comprende antígenos CarLA de L3 de nematodo marcados y

(c) unos medios de recogida de muestras de mucosa;

en el que la muestra de mucosa se selecciona de una muestra de la nariz, garganta, cavidad rectal o vagina.

Preferiblemente el recipiente y los medios de recogida son para una muestra de saliva.

El kit de la invención puede comprender además instrucciones de uso.

El kit también puede comprender medios de detección para detectar un antígeno marcado o para detectar un segundo anticuerpo marcado.

El kit puede comprender uno o más de los antígenos de L3 de nematodo indicados anteriormente.

La invención también proporciona un método para diagnosticar infección por nematodo en un animal ungulado, que comprende las etapas:

(a) obtener una muestra de mucosa del ungulado; y

(b) analizar la muestra para detectar la presencia de un anticuerpo contra antígeno CarLA de L3 de nematodo

en el que la muestra de mucosa se selecciona de una muestra de la nariz, garganta, cavidad rectal o vagina.

La muestra es preferiblemente saliva que puede recogerse y analizarse mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

El antígeno puede comprender uno o más antígenos CarLA de L3 de nematodo seleccionados del grupo que consiste en:

(a) un antígeno de superficie en *C. curticei* que corre a sustancialmente 46 kDa y a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(b) un antígeno de superficie en *N. spathiger* que corre a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(c) un antígeno de superficie en *H. contortus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; y

(d) un antígeno de superficie en *O. circumcincta* que corre a sustancialmente 35-39 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(e) un antígeno de superficie en *T. axei* o *T. vitrinus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(f) un antígeno de superficie en *O. ostertagi* que corre a sustancialmente 30-45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(g) un antígeno de superficie en *C. oncophora* que corre a sustancialmente 20 kDa y a sustancialmente 45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(h) un antígeno de superficie en *N. brasiliensis* que corre a sustancialmente 9 kDa y a sustancialmente 12 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; e

(i) un antígeno de superficie en *D. eckerti* que corre a sustancialmente 30 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras.

El antígeno puede estar inmovilizado sobre una superficie sólida y el complejo se detecta usando un marcador en el antígeno que puede detectarse cuando se forma el complejo. Alternativamente, el complejo puede detectarse usando un segundo anticuerpo marcado que se une al complejo, tal como se describió anteriormente.

- 5 La muestra puede recogerse y someterse a ensayo mediante uno cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

La invención consiste en lo anterior y también concibe construcciones de las cuales lo siguiente sólo proporciona ejemplos.

10 EJEMPLO 1

Materiales y métodos

- 15 Se sometieron corderos, que pastaban en pasto abierto, a 2-4 ciclos de exposición a nematodos mediante lo cual se dejó que se acumulara el FEC hasta 800-1000 epg antes de tomar muestras de heces de los animales y administrarles grandes dosis.

- 20 Se recogió saliva de todos los corderos usando la configuración de toma de muestras de saliva mostrada en la figura 1, mediante lo cual se insertó un rodillo de algodón (1), sujeto mediante pinzas (2), en la boca del cordero entre la mejilla y la mandíbula, y se masajeó la mejilla durante aproximadamente 15 segundos. Se colocó el rodillo de algodón en un vial con código de barras (3), y se escaneó la etiqueta de identidad del animal usando un lector de EID (5), y se leyó el vial con código de barras mediante un lector de código de barras (4). Se hicieron corresponder la EID y la muestra con código de barras usando un sistema Tru-Test XR3000. Esta configuración permite rastrear la muestra directamente hasta el animal del que se tomó.

- 25 Entonces se recogió la saliva centrifugando el rodillo de algodón y se diluyó la saliva con un tampón que contenía un conservante. Entonces se puso en contacto la saliva diluida con una placa de múltiples pocillos recubierta con antígeno CarLA purificado, marcado con color. Una vez que se unió el anticuerpo en la muestra de saliva al antígeno CarLA, se detectó el complejo formado usando anticuerpos apropiadamente marcados anti-anticuerpos, anticuerpos anti-IgG1 ovina o anti-IgA ovina marcados con peroxidasa del rábano o se detectaron adicionalmente con conjugado anti-IgG marcado. Se detectó la reacción química producida usando reacciones de peroxidasa usando un espectrómetro que podía medir la absorbancia del marcador con color (reacción).

- 35 La toma de muestras de saliva y FEC y las pruebas se produjeron regularmente entre 13 y 110 días tras el destete.

Resultados

- 40 El 18% de los corderos tuvieron un resultado positivo para anticuerpos contra CarLA en su saliva. El recuento de huevos en heces de estos animales fue un 32% inferior a los animales negativos para CarLA.

- Volvieron a someterse a prueba los animales aproximadamente de cinco a seis semanas después, y el 61% de los corderos tuvieron un resultado positivo para anticuerpos contra CarLA en su saliva. De estos animales, su FEC fue un 22% inferior a los animales negativos para CarLA.

- 45 Volvieron a someterse a prueba los animales que tuvieron un resultado positivo para CarLA después de 5 a 6 semanas adicionales y tuvieron un FEC un 49,3% inferior al de los animales que habían tenido previamente un resultado negativo.

- 50 Estos resultados se muestran en la figura 3.

Discusión

- 55 Tanto IgG1 como IgA en saliva frente a CarLA se correlacionaron significativamente con FEC reducido. También se midieron los niveles de anticuerpos en suero en muestras de sangre que se extrajeron al mismo tiempo que las muestras de saliva. Sorprendentemente, los niveles de anticuerpos en suero no se correlacionaron tan bien como los niveles de anticuerpos en saliva con FEC (datos no mostrados).

- 60 Los resultados también muestran que la presente prueba de detección de anticuerpos contra CarLA es útil en la selección de corderos protectores frente a huéspedes, incluso cuando los corderos están recibiendo una gran dosis preventiva.

- La toma de muestras puede realizarse en cualquier momento desde aproximadamente 6 hasta 11 semanas o más tras el destete, dependiendo del nivel de exposición en el pasto.

- 65 Estos resultados demuestran que pueden detectarse anticuerpos específicos contra CarLA en la saliva de animales,

y tal detección puede usarse para seleccionar resistencia a huéspedes.

EJEMPLO 2

5 Materiales y métodos

Se dejaron pastar corderos Highlander de Rissington Breedline (n=299) en el pasto infectado con nematodos y se tomaron muestras aleatoriamente (n=30) de saliva, suero y heces a intervalos semanales. Entonces se tomaron muestras de todo el rebaño de saliva, suero y FEC. En este momento se pesaron los animales y se les asignó una puntuación de manchas por heces (toma de muestras 1). Esto se repitió de cinco a ocho semanas después (toma de muestras 2). Se sometieron a ensayo todas las muestras de saliva y de suero semanales y de las tomas de muestras 1 y 2 para detectar IgG1, IgE e IgA específicas para CarLA mediante ELISA.

Resultados

Aproximadamente el 40% del rebaño tuvieron resultados positivos para anticuerpos IgG1 contra CarLA en su saliva. Esto aumentó significativamente al final del ensayo de modo que todos los animales producían niveles detectables de anticuerpo IgG1 frente a CarLA en la saliva. En comparación con los resultados en ejemplo 1, el aumento en la reactividad se debió probablemente a la exposición a nematodos más fuerte y más temprana.

Los resultados de IgG1 e IgA en saliva en las tomas de muestras tanto 1 como 2 se correlacionaron con un FEC reducido en la segunda toma de muestras (FEC2). En particular, la IgG1 en saliva en la toma de muestras 1 (64,1% del rebaño) predijo una reducción del 26,6% del FEC en FEC2, y en la toma de muestras 2 (60,2% del rebaño) predijo una reducción del 25,8% del FEC. La IgA en saliva también se correlacionó con un FEC reducido. La IgA en saliva en la toma de muestras 1 (64,0% del rebaño) predijo una reducción del 29,7% del FEC en FEC2, y en la toma de muestras 2 (35,8% del rebaño) predijo una reducción del 24,7% del FEC.

Los niveles de IgG1, IgA e IgE en suero no se correlacionaron con reducciones de FEC tal como se muestra en la tabla 1, a continuación.

Tabla 1: reducción media del FEC para todas las tomas de muestras semanales

	IgG1 en saliva	IgG1 en suero	IgA en saliva	IgA en suero	IgE en suero
FEC 2	35,3 ± 12,1%	24,7 ± 20,1%	28,8 ± 14,4%	29,5 ± 25,8	9,3 ± 37,3%

IgG1 e IgA en saliva se correlacionaron con las mejores predicciones de reducción del FEC y tuvieron la menor variabilidad.

Discusión

Tanto IgG1 como IgA en saliva frente a CarLA se correlacionaron significativamente con FEC reducido y pudieron predecir el FEC reducido usando los datos o bien de tomas de muestras semanales o bien de toma de muestras 1 o toma de muestras 2. El hecho de que la saliva dio mejores resultados que el suero sugiere que se producen anticuerpos específicos contra CarLA en la cavidad oral para complementar al anticuerpo en el fluido oral derivado del suero mediante un proceso de trasudación.

Los resultados de este ensayo confirman los resultados de ejemplo 1, concretamente que pueden detectarse anticuerpos específicos contra CarLA en la saliva de animales, y pueden usarse para seleccionar la resistencia a huéspedes. Los resultados confirmaron adicionalmente que las pruebas con saliva eran mejores que las pruebas con suero.

50 EJEMPLO 3

Materiales y métodos

Se tomaron muestras de saliva de corderos Highlander de Rissington Breedline (n=315) en el destete [toma de muestras 1] antes de dejarse pastar en pasto abierto. La toma de muestras aleatoria semanal del rebaño (n=50) para muestras de saliva y de recuento de huevos en heces (cuando era apropiado) comenzó en la semana 2. Se tomaron muestras de saliva de todo el rebaño en la semana 8 [toma de muestras 2] y en la semana 16 [toma de muestras 3].

También se tomaron muestras de todo el rebaño de FEC en la semana 8 (FEC1a, epg medios 785 (aritmética)) y en la semana 9 (FEC1b, epg medios 821). Tras la toma de muestras en la semana 9, se administraron grandes dosis a los corderos y se les esquilaron los cuartos traseros.

Se produjo una segunda ronda de toma de muestras para FEC en la semana 17 (FEC2a, epg medios 332), en la semana 18 (FEC2b, epg medios 330) y en la semana 19 (FEC2c, epg medios 365). Tras la toma de muestras en la semana 18, se pesaron los corderos y se les asignó una puntuación de manchas por heces. Se sometieron a ensayo todas las muestras de saliva semanales y de las tomas de muestras 1, 2 y 3 para detectar IgG1 e IgA específicas para CarLA mediante ELISA.

También se llevaron a cabo tomas de muestras de saliva y FEC similares en rebaños registrados de corderos Perendale, Coopworth y Romney.

Se recogieron muestras de saliva y se prepararon para el análisis de CarLA tal como se describió anteriormente en el ejemplo 1.

Resultados

Los anticuerpos específicos para CarLA, IgA, en saliva pudieron predecir una reducción significativa del recuento de huevos en heces en FEC2 en rebaños Highlander, Coopworth y Perendale. Los anticuerpos específicos para CarLA, IgG1, en saliva pudieron predecir una reducción significativa del FEC en los rebaños Highlander, Coopworth y Perendale, pero no en los Romney. El motivo para esta ausencia de respuesta de predicción en el rebaño Romney para IgA e IgG1 en saliva no fue evidente (resultados no mostrados).

Un análisis adicional de los resultados de IgA e IgG1 para corderos Highlander y Coopworth mostró que el mejor momento para tomar muestras de saliva es entre 8 y 16 semanas tras el destete (figura 4).

Un análisis genético de los resultados mostró que las respuestas de IgA e IgG1 contra CarLA eran hereditarias con heredabilidades globales de 0,29 y 0,20 respectivamente. La correlación genética de anticuerpo contra CarLA con FEC fue de entre -0,27 y -0,51 para IgG1 y de -0,23 y -0,72 para IgA.

El análisis de la relación fenotípica entre anticuerpo contra CarLA en la saliva y el ensuciamiento de los cuartos traseros ("manchas por heces") o la productividad tal como se midió como peso o aumento de peso mostró que cualquier correlación adversa, si era significativa, era débil. En cambio, hubo correlaciones sistemáticamente desfavorables entre el FEC y rasgos de productividad.

Cultivo de larvas

Se tomaron muestras de heces de ovejas hembra Highlander en FEC2c y se cultivaron larvas mediante métodos conocidos. Los datos se muestran en la tabla 2, a continuación.

Tabla 2

Nematodo	% medio (n=5)
<i>Haemonchus</i>	34%
<i>Ostertagia</i>	42%
<i>Trichostrongylus</i>	9%
<i>Cooperia</i>	14%
Cola larga	1%

Los cultivos de larvas de FEC2c mostraron que *Trichostrongylus* constituía menos del 10% de las larvas que se desarrollaron a partir de huevos excretados por las ovejas hembra Highlander. Sin embargo, las respuestas de IgA frente a CarLA de *T. colubriformis* medidas ocho semanas antes de la toma de muestras de FEC2c y una semana antes de la toma de muestras de FEC2c predijeron reducciones significativas del FEC en la toma de muestras de FEC2 de modo que este resultado concordaba con la predicción de la prueba de saliva.

EJEMPLO 4

Con el fin de ampliar los estudios de validación del antígeno de superficie de larvas de hidratos de carbono (CarLA) a diferentes tipos de tratamiento y de razas, se tomaron muestras de un rebaño de 289 corderos Merino para el recuento de huevos en heces (FEC) y de saliva, tras el destete. Los FEC (*strongyles*) no se habían acumulado hasta un nivel grave en el momento de la toma de muestras aproximadamente 5 meses tras el destete y el promedio de FEC transformados de vuelta fue de 197 huevos/g. Se contaron los huevos de *Nematodirus* (NEM) en el mismo momento y su promedio fue de 101 huevos/g (recuento de huevos logarítmico transformados de vuelta). Antes de toma de muestras, el rebaño había experimentado un brote agudo de NEM tres meses antes, momento en el cual se administraron grandes dosis al rebaño, por tanto era probable que estuviera midiéndose la capacidad de las ovejas para responder a una infección por exposición. La infección por NEM fue biológicamente más significativa que la infección por *strongyle*, y esto se muestra en las correlaciones entre los recuentos de huevos y las concentraciones

en saliva. Para NEM, las correlaciones con IgG1 e IgA en saliva (unidades) fueron significativas ($P < 0,0378$ y $P < 0,0001$, respectivamente). Concentraciones en saliva superiores indicaron menores recuentos de huevos de NEM. Un análisis genético de los resultados mostró que la respuesta de IgG1 frente a CarLA era significativamente hereditaria ($0,657 \pm 0,286$) pero aparentemente no IgA, al contrario que los hallazgos de otros conjuntos de datos más grandes y razas. Pocas correlaciones genéticas tuvieron errores estándar lo bastante pequeños como para proporcionar interpretaciones útiles, excepto por NEM x IgG1 ($-0,716 \pm 0,216$) que era significativamente negativo, tal como se esperaba a partir de otras razas de datos analizados. La estimación de la correlación genética para NEM x IgA también fue significativa, aunque la estimación estaba fuera del límite superior de 1,0 esperado, de modo que puede que el resultado sea biológicamente significativo o no.

Discusión

IgG1 e IgA en saliva estuvieron significativamente correlacionadas con FEC reducido en varias razas de ovejas diferentes.

La respuesta de anticuerpos de IgG1 e IgA en saliva tanto fue hereditaria como estuvo genéticamente correlacionada con FEC reducido lo que sugiere que la selección de animales basándose en estas pruebas dará como resultado la reducción de FEC en animales.

La toma de muestras se lleva a cabo mejor entre 8 y 16 semanas tras el pastoreo en el pasto infestado por nematodos.

No hubo fuertes correlaciones desfavorables entre respuestas de anticuerpos contra CarLA (IgA o IgG1) y rasgos tales como aumento de peso o ensuciamiento de los cuartos traseros.

Estos resultados demuestran que pueden detectarse anticuerpos específicos contra CarLA en la saliva de varias razas de ovejas diferentes y usarse para predecir una reducción del FEC en animales individuales. Por tanto, una prueba de este tipo es útil para seleccionar resistencia a huéspedes. Esta prueba es particularmente útil para seleccionar resistencia a nematodos *Trichostrongylus*.

EJEMPLO 5

Procesamiento y ensayo de saliva mejorados

La extracción de saliva a partir rodillo de algodón puede ayudarse mediante centrifugación del rodillo de algodón tras haberse recogido la saliva. Tal como se ilustra en la figura 5, se transfiere rodillo de algodón a un vial de 5 ml limpio (1). Esto se fija a un adaptador (2) (Lab-Serv) que tiene un filtro de plástico abierto (3). El vial etiquetado original (4) se fija al otro lado del adaptador. Se coloca la configuración completa en una centrifugadora con el extremo del rodillo de algodón hacia arriba. Esto se centrifuga durante 2-5 min. a 2000 g en una centrifugadora apropiada. La saliva extraída se retiene en el vial etiquetado, lista para su dilución para someter a ensayo para detectar anticuerpo específico para CarLA.

Los inventores también han encontrado que el uso de placas de ELISA recubiertas con CarLA y almacenadas a 4°C, al contrario que el almacenamiento a -20°C, da como resultado resultados de ensayo más sistemáticos.

Además, el uso de un método de patrón de referencia en el que se realiza un análisis de regresión lineal simple de datos transformados logarítmicos o logit-logarítmicos obtenidos mediante titulación de patrón de referencia preparado a partir de suero positivo para anticuerpo contra CarLA combinado diluido en serie, da como resultado resultados de ensayo más sistemáticos que el uso de un método de índice de densidad óptica.

EJEMPLO 6

Debe llevarse a cabo una toma de muestras adicional en rebaños registrados de diversas razas incluyendo Romney, Coopworth, Merino y Highlander para evaluar con mayor precisión la capacidad de un anticuerpo contra CarLA para predecir un FEC reducido en estas razas. En particular se analizarán rebaños registrados que experimentan infección por *Haemonchus contortus* para determinar su respuesta de anticuerpos contra CarLA en relación con FEC reducido. Se tomarán muestras adicionales de razas de las que ya se tomaron muestras de tipos Romney, Highlander, Coopworth y Merino para aumentar el tamaño de muestra para evaluar la heredabilidad de anticuerpo contra CarLA y las correlaciones genéticas con FEC y otros parámetros. Se espera que IgA e IgG1 en saliva predecirán con precisión una reducción en FEC en animales individuales que serán útiles para seleccionar resistencia a huéspedes.

EJEMPLO 7

Materiales y métodos

Se expondrán terneros bovinos que pastan en pasto abierto a 2-4 ciclos de exposición a nematodos mediante lo cual el FEC se acumulará hasta aproximadamente 800-1000 epg antes de tomar muestras de heces de los animales y administrarles grandes dosis.

Se recogerá saliva de los terneros bovinos como para las especies de ovejas y se someterá a prueba para detectar la presencia de antígeno CarLA tal como se describió anteriormente.

Resultados

Se espera que los terneros bovinos tendrán resultados positivos para anticuerpos contra CarLA en su saliva. Específicamente, es probable que se detecte CarLA de los nematodos *O. ostertagi* y *C. oncophora* bovinos.

La prueba de la presente invención será útil en la selección de animales bovinos resistentes a huéspedes.

EJEMPLO 8 comparativo

Cría de animales resistentes a huéspedes

Los resultados de la concentración de IgA de animales de pastoreo tal como se describió anteriormente, pueden transformarse en una escala logarítmica, y calcularse valores de cría con resistencia a parásitos (BV) a partir de logIgA, usando procedimientos estadísticos de "probabilidad máxima restringida a modelos de animales" publicados por Gilmour, A.R. (1997). Estos procedimientos usan registros de logIgA para todos los pedigrís conocidos. Tienen en cuenta el hecho de que el rasgo de IgA se hereda, de modo que los registros de familiares (por ejemplo, animales con un progenitor común, o gemelos con dos progenitores comunes) se vuelven útiles para ayudar a la predicción de la utilidad más probable de un individuo como progenitor (su BV). A partir de los resultados de BV de resistencia a parásitos, se clasifican todos los animales de un sexo, y se usan aquellos con los mejores BV como progenitores de la siguiente generación. La lista de clasificación de BV puede incluir animales registrados y no registrados, dependiendo los BV de los animales no registrados totalmente de los datos de familiares registrados.

No se pretende limitar el alcance de la invención únicamente al ejemplo mencionado anteriormente. Tal como apreciará un experto en la técnica, son posibles muchas variaciones sin apartarse del alcance de la invención tal como se reivindica en el juego de reivindicaciones adjuntas.

Aplicación industrial

La prueba de diagnóstico en saliva de la presente invención puede usarse para seleccionar animales que son genéticamente resistentes a parásitos intestinales, particularmente gusanos nematodos, para reducir el uso de antihelmínticos.

Bibliografía

Harrison GB, Pulford HD, Hein WR, Barber TK, Shaw, RJ, McNeill M, Wakefield SJ, Shoemaker CB. Immune rejection of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep; a possible role for intestinal mucus antibody against an L3-specific surface antigen. *Parasite Immunology* 2003, 25(1): 45-53.

Gilmour, AR. ASREML for testing fixed effects and estimating multiple trait variance components. *Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics* 1997, 12:386-390.

REIVINDICACIONES

1. Método de selección de ungulados que son genéticamente resistentes a infecciones por uno o más gusanos nematodos, comprendiendo dicho método las etapas:
 - (a) obtener una muestra de mucosa de dicho ungulado;
 - (b) someter a prueba la muestra para detectar la presencia de un anticuerpo contra el antígeno de cubierta protectora de hidratos de carbono (CarLA) presente en la tercera fase larvaria (L3) de dicho uno o más gusanos nematodos; y
 - (c) separar y seleccionar ungulados que tienen un resultado positivo para el anticuerpo en la etapa (b), en el que la muestra de mucosa comprende fluido mucoso de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina.
2. Método según la reivindicación 1, en el que la muestra de mucosa comprende saliva.
3. Método según la reivindicación 1, en el que el uno o más gusanos nematodos se seleccionan del grupo que consiste en *Trichostrongylus colubriformis*, *Haemonchus contortus*, *Ostertagia (Teladorsagia) circumcincta*, *Cooperia curticei*, *Nematodirus spathiger*, *Trichostrongylus axei*, *Trichostrongylus vitrinus*, *Ostertagia ostertagi*, *Cooperia oncophora*, *Nematodirus brasiliensis* y *Dictyocaulus eckerti*.
4. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el anticuerpo comprende anticuerpo monoclonal AcM PAB-1 (n.º de registro de ATCC PTA-4005), que se une específicamente al antígeno de superficie CarLA en L3 de nematodo.
5. Método para detectar la presencia de anticuerpos que son específicos para un antígeno de superficie CarLA de L3 presente en una o más especies de gusanos nematodos en una muestra de mucosa de un ungulado, comprendiendo dicho método las etapas:
 - (a) obtener una muestra de mucosa de dicho ungulado que comprende fluido mucoso de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina;
 - (b) poner en contacto dicha muestra con el antígeno de superficie CarLA de L3, formando así un complejo anticuerpo/antígeno; y
 - (c) detectar la presencia o ausencia del complejo;
 en el que la presencia de dicho complejo anticuerpo/antígeno es indicativa de un ungulado que es genéticamente resistente a infección por gusano nematodo.
6. Método según la reivindicación 5, en el que la muestra de mucosa es saliva.
7. Método según la reivindicación 5 ó 6, en el que el antígeno se selecciona de uno o más antígenos CarLA de L3 de nematodo seleccionados del grupo que consiste en:
 - (a) un antígeno de superficie en *C. curticei* que corre a sustancialmente 46 kDa y a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - (b) un antígeno de superficie en *N. spathiger* que corre a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - (c) un antígeno de superficie en *H. contortus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; y
 - (d) un antígeno de superficie en *O. circumcincta* que corre a sustancialmente 35-39 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - (e) un antígeno de superficie en *T. axei* o *T. vitrinus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - (f) un antígeno de superficie en *O. ostertagi* que corre a sustancialmente 30-45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;
 - (g) un antígeno de superficie en *C. oncophora* que corre a sustancialmente 20 kDa y a sustancialmente 45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(h) un antígeno de superficie en *N. brasiliensis* que corre a sustancialmente 9 kDa y a sustancialmente 12 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; y

(i) un antígeno de superficie en *D. eckerti* que corre a sustancialmente 30 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras.

8. Método según la reivindicación 7, en el que el antígeno está inmovilizado sobre una superficie sólida y el complejo se detecta usando un marcador en el antígeno que es detectable cuando se forma el complejo.

9. Método según la reivindicación 8, en el que el complejo se detecta usando un segundo anticuerpo marcado que se une al complejo.

10. Método según la reivindicación 8 ó 9, en el que la detección se lleva a cabo usando una tira reactiva que comprende uno o más antígenos inmovilizados.

11. Kit para detectar la presencia de un anticuerpo específico para uno o más antígenos de superficie CarLA de L3 de nematodo, comprendiendo dicho kit:

(a) un recipiente para una muestra de mucosa;

(b) un reactivo que comprende uno o más antígenos CarLA de L3 de nematodo marcados; y

(c) unos medios de recogida de muestras de mucosa;

en el que la muestra de mucosa se selecciona de una muestra de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina.

12. Kit según la reivindicación 11, que comprende

(d) una tira reactiva que comprende uno o más antígenos CarLA de L3 de nematodo inmovilizados; y

(e) un reactivo que comprende un segundo anticuerpo marcado.

13. Kit según la reivindicación 11 ó 12, en el que el recipiente de muestra es para saliva.

14. Kit según la reivindicación 11 ó 12, en el que los medios de recogida son para recoger saliva.

15. Kit según la reivindicación 11, que comprende además instrucciones de uso.

16. Kit según una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, que comprende además medios de detección para detectar uno o más antígenos marcados.

17. Kit según la reivindicación 12, que comprende además medios de detección para detectar un segundo anticuerpo marcado.

18. Método de diagnóstico de infección por nematodo en un animal ungulado que comprende las etapas:

(a) obtener una muestra de mucosa del ungulado; y

(b) analizar la muestra para detectar la presencia de un anticuerpo contra uno o más antígenos CarLA de L3 de nematodo;

en el que la muestra de mucosa se selecciona de una muestra de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina.

19. Método de determinación de resistencia a nematodos en un ungulado sometiendo a ensayo una muestra de mucosa del ungulado para detectar la presencia de un anticuerpo específico para uno o más antígenos CarLA de L3 de muestra, poniendo en contacto la muestra con uno o más antígenos seleccionados del grupo que consiste en:

(a) un antígeno de superficie en *C. curticei* que corre a sustancialmente 46 kDa y a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(b) un antígeno de superficie en *N. spathiger* que corre a sustancialmente 22 kDa en gel de SDS-PAGE en

condiciones reductoras;

(c) un antígeno de superficie en *H. contortus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; y

5 (d) un antígeno de superficie en *O. circumcincta* que corre a sustancialmente 35-39 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

10 (e) un antígeno de superficie en *T. axei* o *T. vitrinus* que corre a sustancialmente 35 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(f) un antígeno de superficie en *O. ostertagi* que corre a sustancialmente 30-45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

15 (g) un antígeno de superficie en *C. oncophora* que corre a sustancialmente 20 kDa y a sustancialmente 45 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras;

(h) un antígeno de superficie en *N. brasiliensis* que corre a sustancialmente 9 kDa y a sustancialmente 12 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras; y

20 (i) un antígeno de superficie en *D. eckerti* que corre a sustancialmente 30 kDa en gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras,

25 y medir la presencia o ausencia de complejo anticuerpo/antígeno en la muestra, mediante lo cual la presencia del complejo es indicativa de resistencia a nematodos en el ungulado, y en el que la muestra de mucosa se selecciona de una muestra de la nariz, boca, garganta, cavidad rectal o vagina.

20. Método de diagnóstico de infección por nematodo según la reivindicación 18 o método de determinación de la resistencia a nematodos según la reivindicación 19, en el que la muestra de mucosa es saliva.

Figura 1

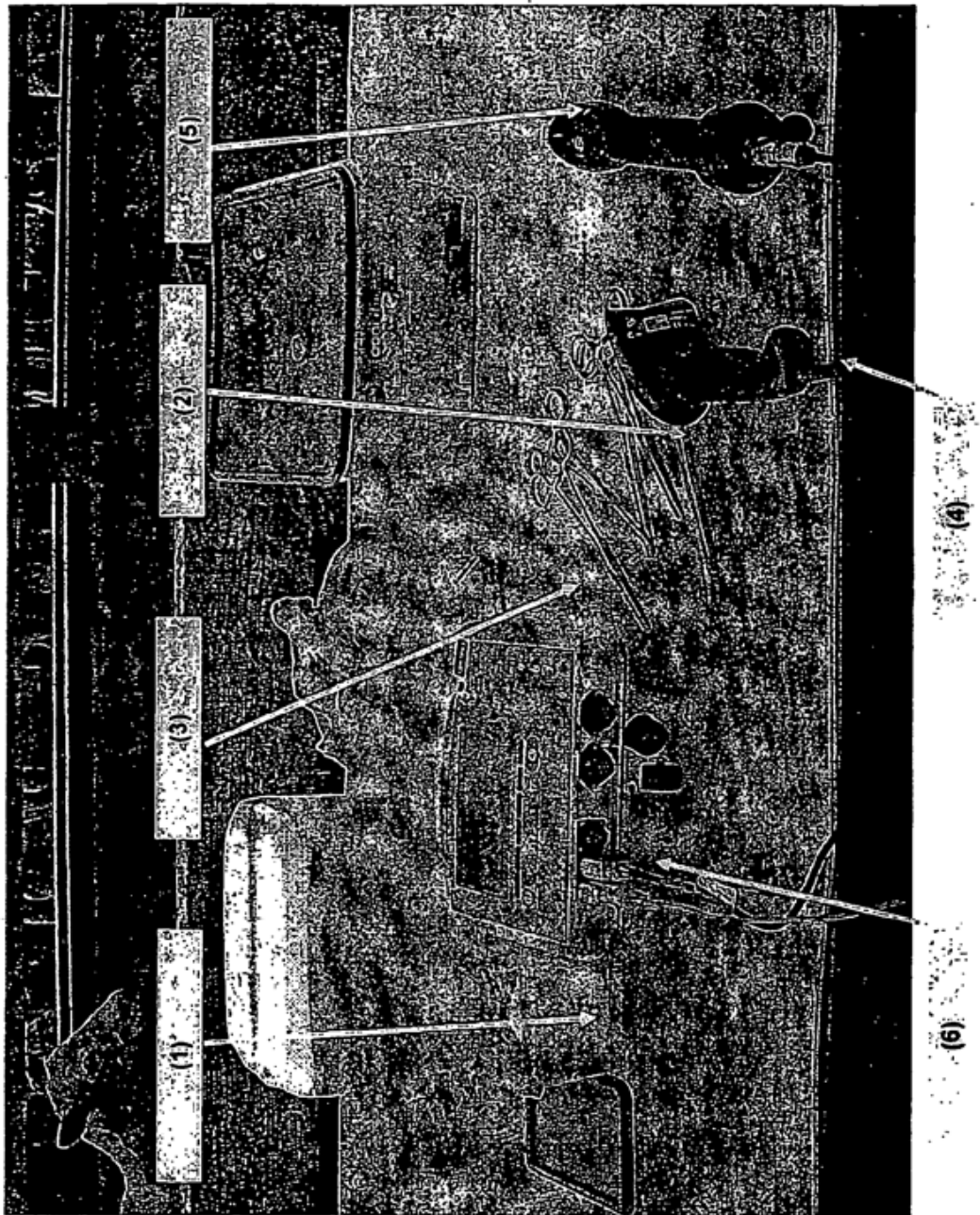


Figura 2



Figura 3

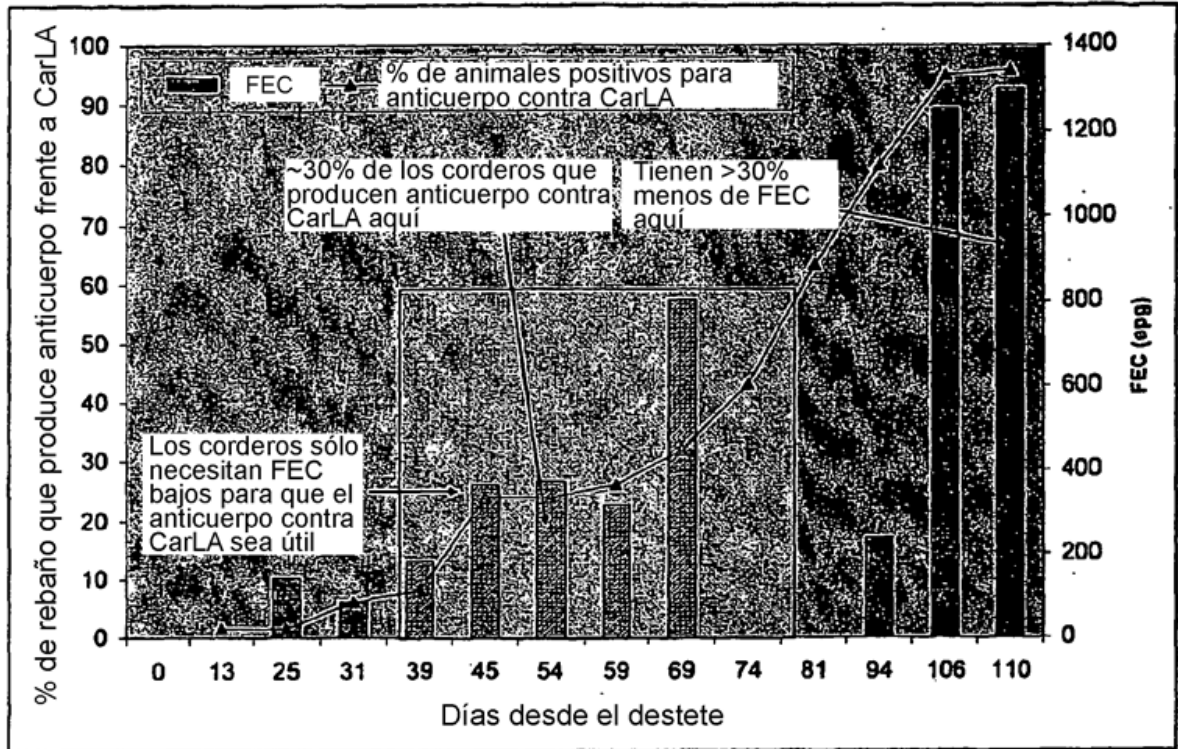


Figura 4

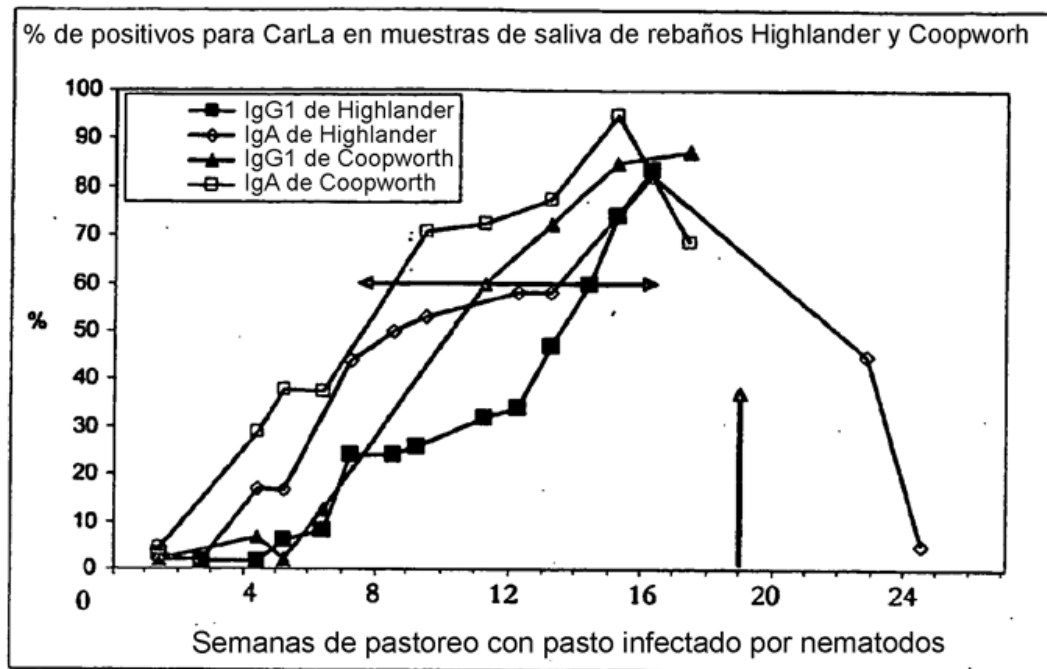


Figura 5

