

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 474 155**

51 Int. Cl.:

G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.06.2008 E 08768409 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.04.2014 EP 2164948**

54 Título: **Dispositivo, kit y procedimiento para la captura y detección de antígenos de anquilostoma**

30 Prioridad:

15.06.2007 US 763583

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

08.07.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**ELSEMORE, DAVID, ALLEN y
FLYNN, LAURIE, A.**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 474 155 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

Dispositivo, kit y procedimiento para la captura y detección de antígenos de anquilostoma

5 **Antecedentes de la invención**1. **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a dispositivos, kits y procedimientos para la detección de anquilostoma en animales. Más particularmente, la invención se refiere a dispositivos basados en anticuerpos, kits y procedimientos para capturar y detectar antígenos de anquilostoma en las heces de un animal con el fin de diagnosticar que tal animal tiene o no tiene una infección por anquilostoma. Incluso más particularmente, la invención se refiere a dispositivos basados en anticuerpos, kits y procedimientos para diagnosticar una infección por anquilostoma en un animal antes o después de que los huevos de anquilostoma aparezcan por primera vez en las heces del animal. Todavía más particularmente, la invención se refiere a dispositivos basados en anticuerpos, kits y procedimientos para confirmar la presencia o ausencia de una infección por anquilostoma en un animal independientemente de si ese animal está infectado o no por uno o más de ascáride, tricocéfalo, céstodo y gusano del corazón.

2. **Descripción de la técnica anterior**

Los anquilostomas son parásitos intestinales hematófagos que pueden hacer que su portador sufra enfermedad grave, tal como anemia, debilitamiento y desarrollo retardado. Por ejemplo, el anquilostoma *Ancylostoma caninum* produce enfermedad significativa en tanto perros como seres humanos (Prociv y col., Acta Trop. septiembre de 1996; 62(1): 23-44). El diagnóstico de una infección por anquilostoma normalmente se realiza siguiendo el procedimiento de flotación fecal, que implica obtener una muestra fecal del animal que se diagnostica e inspeccionarla visualmente por microscopio para huevos de anquilostoma. Sin embargo, este procedimiento de diagnóstico microscópico requiere tiempo y requiere equipo especializado. Además, la exactitud del diagnóstico usando este procedimiento es altamente dependiente de la habilidad y experiencia del profesional clínico que realiza la inspección. (Por ejemplo, un ojo inexperto frecuentemente confundirá huevos de otros nematodos parasitarios con los de anquilostoma y viceversa.) Esta posibilidad de diagnóstico erróneo es desafortunada debido a que a un animal erróneamente diagnosticado puede dársele un tratamiento que es ineficaz contra anquilostoma y por tanto no se aliviaría el sufrimiento del animal o no se detendría el debilitamiento progresivo de su salud.

Otra limitación significativa del diagnóstico por detección microscópica de huevos es que debido a que los huevos de anquilostoma generalmente no son detectables en heces del portador hasta mucho después de manifestarse la infección, ello no permite una detección temprana de la infección por anquilostoma. Por ejemplo, los huevos de anquilostoma generalmente no aparecen en las heces caninas hasta aproximadamente 17 días después de la ingestión por vía oral del parásito por el can. Esto es un problema debido a que síntomas tales como pérdida grave de peso y diarrea hemorrágica frecuentemente hacen sufrir al portador antes de que los huevos de anquilostoma aparezcan por primera vez en las heces. Por tanto la detección temprana es altamente deseable.

Por estos motivos, sigue habiendo grandes posibilidades de desarrollo de un dispositivo, kit y procedimiento que pueda usarse para diagnosticar correctamente a un animal como que tiene o no tiene una infección por anquilostoma, específicamente, a diferencia de una infección por nematodos, generalmente. También sigue habiendo grandes posibilidades de un dispositivo y procedimiento tales que puedan usarse para hacer este diagnóstico pronto después de infectarse el animal. Además, es deseable tener un dispositivo y procedimiento tales adecuados para detectar anquilostoma en una muestra de animal que sea fácilmente obtenible. Una muestra particularmente conveniente es heces debido a que a diferencia de la sangre, por ejemplo, las heces son rápidamente excretadas por los animales. La capacidad para usar una muestra de animal que se obtiene fácilmente obviaría la necesidad de transportar el animal, que en algunos casos puede estar demasiado enfermo para viajar, a un profesional veterinario para la recogida de la muestra, tal como puede necesitarse cuando debe recogerse, por ejemplo, sangre.

Dado que el dispositivo, kit y procedimiento necesarios deben poder detectar la presencia o confirmar la ausencia de anquilostoma en un animal si están o no organismos de anquilostoma, incluyendo huevos de anquilostoma, en la muestra de prueba tomada del animal, el dispositivo y procedimiento deben tener como objetivo el nivel molecular. En particular, el dispositivo, kit y procedimiento pueden ser un dispositivo y procedimiento basados en anticuerpos que son capaces de detectar la presencia o ausencia de antígenos específicos de anquilostoma. Aunque generalmente existen estrategias basadas en anticuerpos para detectar antígenos de nematodos, ninguna ha permitido específicamente la detección temprana de, o confirmación de la ausencia de, anquilostoma en una muestra fecal de un animal que también puede infectarse por uno o más de ascáride, tricocéfalo, céstodo y gusano del corazón.

A partir del documento US 2004/214244 se conoce un procedimiento general para la detección de una infección por gusano parasitario. No se describe antígeno específico para anquilostoma. Lo mismo es cierto para el documento WO 03/032917 y para Jones y col., Drug Discovery Today: Disease Mechanismus, Elsevier, vol. 1, n.º: 2, 1 de noviembre de 2004, páginas 217-222, que no desvelan un antígeno de diagnóstico específico, sino que se refieren solo a vacunación.

Por tanto lo que se necesita es un dispositivo, kit y procedimiento para probar una muestra fecal de un animal para determinar si el animal está infectado por anquilostoma. El dispositivo, kit y procedimiento necesarios deben adicionalmente poder detectar específicamente la presencia o ausencia de anquilostoma en un animal tanto si están presentes como si no huevos de anquilostoma en las heces del animal. Incluso además, el dispositivo, kit y procedimiento necesarios deben poder detectar específicamente anquilostoma en una muestra fecal que también puede incluir uno o más de ascáride, tricocéfalo, céstodo y gusano del corazón.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de propiedades inesperadas de un anticuerpo policlonal. Específicamente, se determinó que un anticuerpo policlonal producido contra proteína 5 secretada de *Ancylostoma caninum* de anquilostomas (ASP5) puede usarse para capturar y detectar la presencia de coproantígenos de anquilostoma en un animal canino tan pronto como entre nueve días y 13 días después de que el can se haya infectado por anquilostoma. Antes de la presente invención no se sabía si cualquier proteína de nematodos parasitarios aparecía o no en las heces de un portador canino antes de la aparición de los huevos de nematodos. La capacidad de la presente invención para detectar la proteína ASP5 tan rápidamente después de que la infección se introduzca al portador es interesante debido a que significa que los coproantígenos de anquilostoma reconocidos por el anticuerpo policlonal aparecen en las heces del portador antes de que cualquier anquilostoma completo, incluyendo huevos de anquilostoma, aparezca en las heces. El procedimiento de detección se define como se ha descrito en las reivindicaciones de procedimiento adjuntas.

Además, se determinó que el mismo anticuerpo policlonal puede usarse para capturar y detectar la presencia o ausencia de coproantígenos de anquilostoma en animales que también están infestados por uno o más de ascáride, tricocéfalo, céstodo y gusano del corazón. Esta especificidad por anquilostoma es sorprendente debido a que los anquilostomas, ascárides, tricocéfalos y gusanos del corazón son todos nematodos relacionados y cabría esperar que un anticuerpo policlonal producido contra una proteína particular de uno cualquiera de estos gusanos reaccionara de forma cruzada con uno o más de los otros gusanos. La invención incluye condiciones de ensayo según las que este anticuerpo policlonal puede usarse para capturar y detectar específicamente la presencia o ausencia de coproantígenos de anquilostoma en animales, incluyendo en animales también infestados por uno o más de ascáride, tricocéfalo, céstodo y gusano del corazón.

La invención, en un aspecto, es un dispositivo para detectar la presencia o ausencia de coproantígeno de anquilostoma, como se describe en las reivindicaciones de dispositivo adjuntas. La invención proporciona además un dispositivo tal para detectar la presencia o ausencia de coproantígeno de anquilostoma en un mamífero que está infectado por uno o más de ascáride, tricocéfalo, céstodo y gusano del corazón. El dispositivo de la invención incluye un soporte sólido, en el que uno o más anticuerpos policlonales específicos para la proteína de anquilostoma ASP5 se inmovilizan sobre el soporte sólido.

En ciertos aspectos de la invención, el dispositivo de la invención incluye un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral. En otros aspectos de la invención, el dispositivo de la invención incluye un dispositivo de inmunoabsorción enzimática (ELISA).

La invención incluye un procedimiento para detectar la presencia o ausencia de coproantígeno de anquilostoma según se define en las reivindicaciones. El procedimiento incluye aplicar una muestra fecal a los anticuerpos específicos para la proteína de anquilostoma ASP5 y capturar y detectar la presencia o ausencia de ASP5 en esa muestra fecal. La etapa de detección puede incluir la detección de la presencia o ausencia de un complejo de antígeno/anticuerpo. El procedimiento puede implicar adicionalmente proporcionar un segundo anticuerpo que se une al antígeno del complejo de antígeno/anticuerpo.

La invención incluye adicionalmente kits de ensayo para detectar coproantígeno de anquilostoma según se define en las reivindicaciones. Por tanto un kit incluye uno o más dispositivos de la presente invención. El kit incluye anticuerpos anti-anquilostoma y por ejemplo medios para determinar la unión de los anticuerpos a antígenos de anquilostoma en la muestra. En un ejemplo particular, un kit tal incluye el dispositivo que tiene un anticuerpo anti-anquilostoma inmovilizado, uno o más reactivos de captura de antígenos (por ejemplo, un reactivo de captura de antígeno marcado no inmovilizado y un reactivo de captura de antígeno inmovilizado) y reactivo de lavado, así como reactivo detector y reactivos de control positivo y negativo, si se desea o es apropiado. Otros componentes tales como tampones, controles y similares, pueden incluirse en tales kits de prueba. Un kit puede incluir adicionalmente instrucciones para llevar a cabo uno o más procedimientos de la presente invención, incluyendo instrucciones para usar cualquier dispositivo de la presente invención que se incluye con el kit.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1A muestra un dispositivo de placa de múltiples pocillos de la presente invención.

La FIG. 1B muestra una imagen de cerca de un único pocillo de la placa de la FIG. 1A con una representación de ejemplo de anticuerpos inmovilizados a ella.

La FIG. 2 muestra una gráfica de valores de densidad óptica (DO) obtenidos de muestras fecales de canes sin infectar y de canes infectados por anquilostoma siguiendo un procedimiento de la presente invención en un primer experimento.

5 La FIG 3 muestra una primera gráfica de valores de DO obtenidos de muestras fecales de canes infectados por anquilostoma siguiendo un procedimiento de la presente invención en un segundo experimento.

La FIG 4 muestra una segunda gráfica de valores de DO obtenidos de muestras fecales de canes sin infectar siguiendo un procedimiento de la presente invención en el segundo experimento.

10 La FIG 5 muestra una tercera gráfica de valores de DO obtenidos de muestras fecales de canes infectados por ascáride siguiendo un procedimiento de la presente invención en el segundo experimento.

La FIG 6 muestra una cuarta gráfica de valores de DO obtenidos de muestras fecales de canes infectados por tricocéfalo siguiendo un procedimiento de la presente invención en el segundo experimento.

15 La FIG 7 muestra una gráfica de valores de DO obtenidos de muestras fecales de canes sin infectar y de canes infectados bien con anquilostoma, bien con ascáride, bien con tricocéfalo o bien con céstodo siguiendo un procedimiento de la presente invención en un tercer experimento.

20 La FIG 8 muestra una gráfica de valores de DO obtenidos de muestras fecales de canes sin infectar y canes infectados bien con anquilostoma o bien con gusano del corazón siguiendo un procedimiento de la presente invención en un cuarto experimento.

25 Descripción detallada de la realización preferida

La presente invención, en un aspecto, es un dispositivo para el diagnóstico de infección por anquilostoma en un animal, tal como un mamífero. Por tanto el dispositivo puede usarse para diagnosticar infección por anquilostoma en por ejemplo un canino o felino. En un aspecto de la invención, el dispositivo usa anti-Ac-ASP-5 pAB para detectar la presencia o ausencia de anquilostoma en una muestra fecal del animal. El dispositivo confirma específicamente la presencia o ausencia de anquilostoma incluso cuando la muestra incluye coproantígenos de uno o más de ascáride, tricocéfalo, céstodo y gusano del corazón. El dispositivo incluye un soporte sólido, en el que por ejemplo anti-Ac-ASP-5 pAB se inmoviliza sobre el soporte sólido.

30 Como se muestra en las FIG. 1A y 1B, el dispositivo de la presente invención es, por ejemplo, una placa 10 de múltiples pocillos que incluye una pluralidad de pocillos 12. Cada pocillo 12 proporciona un soporte 14 sólido para inmovilizar sobre el mismo anti-Ac-ASP-5 pAB 16. La placa 10 puede ser una placa de 96 pocillos Immulon 1B, pero no se limita a esta.

40 Anti-Ac-ASP-5 pAB 16 se inmoviliza sobre el soporte 14 sólido del pocillo 12 de la placa 10 por adsorción física. La inmovilización de anti-Ac-ASP-5 pAB 16 sobre el soporte sólido 14 se realiza de manera que anti-Ac-ASP-5 pAB 16 no se lave por procedimientos de lavado que puedan realizarse y de manera que la unión específica de coproantígenos a anti-Ac-ASP-5 pAB 16 sea no impedida por el soporte 14 sólido o por otra superficie de dispositivo mientras que el procedimiento de la presente invención se esté realizando. El dispositivo 10 de la presente invención es adecuado para detectar antígeno de anquilostoma mediante el procedimiento de la presente invención, que puede incluir realizar un ensayo de ELISA.

45 El procedimiento de la invención puede usarse para detectar uno o más antígenos de anquilostoma en una muestra. La muestra de prueba usada en el procedimiento de la invención es una muestra fecal. El procedimiento de la invención puede usarse para probar una muestra fecal de cualquier mamífero, tal como un canino o un felino.

50 El dispositivo 10 de la presente invención, que incluye anti-Ac-ASP-5 pAB 16 inmovilizado sobre el soporte 14 sólido, puede usarse conjuntamente con un procedimiento de la presente invención para detectar anquilostoma en la muestra fecal. Específicamente, una infección activa por anquilostomas de un animal puede diagnosticarse detectando uno o más coproantígenos de anquilostoma con anti-Ac-ASP-5 pAB 16 que se inmoviliza sobre el soporte 14 sólido del dispositivo 10. "Coproantígenos de anquilostoma" son cualesquiera componentes de anquilostoma presentes en una muestra fecal (por ejemplo, la fracción soluble de una muestra fecal) que puede unirse específica y establemente a anti-Ac-ASP-5 pAB 16. Por tanto, los coproantígenos de anquilostoma pueden ser anquilostoma completo, fragmentos de anquilostoma, productos secretados, excretados o mudados de anquilostoma o una combinación de los mismos.

60 "Específico por" o "se une establemente" significa que anti-Ac-ASP-5 pAB 16 reconoce y se une a coproantígenos de anquilostoma con mayor afinidad que a otros coproantígenos (por ejemplo, coproantígenos de uno o más de ascáride, tricocéfalo, céstodo y gusano del corazón). La especificidad de unión puede probarse usando metodología muy conocida en la técnica, por ejemplo, ELISA, transferencia Western o un radioinmunoensayo (RIA).

65 En un aspecto del procedimiento de la presente invención, el antígeno de anquilostoma se detecta por ELISA. Debe entenderse que el ELISA en el procedimiento de la presente invención puede realizarse según cualquier variación del procedimiento de ELISA conocido en la técnica. En un aspecto del procedimiento de la presente invención, una muestra

fecal preparada como se describe del siguiente modo se añade a uno de los pocillos 12 de la placa 10 que contiene inmovilizados anti-Ac-ASP-5 pAB 16. Cualquier antígeno presente en la muestra fecal que sea específico para anti-Ac-ASP-5 pAB 16 se deja que se una específicamente al anti-Ac-ASP-5 pAB 16 inmovilizado. El anti-Ac-ASP-5 pAB libre se marca, tal como con peroxidasa de rábano picante (HRP) usando el reticulador 4-[N-maleimidometil]ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), por ejemplo, para crear un conjugado que puede unirse específicamente al antígeno que se une específicamente a anti-Ac-ASP-5 pAB 16 inmovilizado. Después de la adición de un reactivo de sustrato enzimático-cromógeno, el anti-Ac-ASP-5 pAB marcado unido a anti-Ac-ASP-5 pAB 16 inmovilizado se detecta mediante espectrofotometría. En esta disposición, el valor de densidad óptica (DO) obtenido para cualquier pocillo 12 particular de la placa de 96 pocillos 10 es directamente proporcional a la cantidad de antígeno específicamente unido presente en el pocillo. Sigue un ejemplo específico del procedimiento de ELISA de la presente invención.

El procedimiento de la presente invención se describe más específicamente con referencia a un ejemplo, que incluye cuatro experimentos; sin embargo, no debe interpretarse que se limite a estos.

15 Ejemplo

Los siguientes materiales y procedimientos se usaron para generar datos descritos en los Experimentos 1-4 descritos a continuación.

20 Infección y tratamiento antihelmíntico de animales caninos. Para los Experimentos 1 y 2, la infección por nematodos parasitarios se efectuó administrando por vía oral aproximadamente 150-300 huevos larvados bien de anquilostoma, bien de ascáride, o bien de tricocéfalo a un can beagle sano, lo que se produjo en una dieta controlada durante los Experimentos 1 y 2. Además, para el Experimento 2 solo, los canes se trataron el día 91 después de la infección con Interceptor®, que es un agente antihelmíntico comercialmente disponible de Novartis Animal Health Inc. de Basilea, Suiza, según el protocolo del fabricante. Se conoce bien por aquellos de habilidad normal en la técnica que Interceptor® es eficaz para la eliminación de nematodos parasitarios de animales caninos. Para los Experimentos 3 y 4, los animales caninos no se infectaron artificialmente como se describe para los Experimentos 1 y 2, sino que en su lugar fueron ellos los que desarrollaron infección a anquilostoma, ascáride, tricocéfalo, céstodo o gusano del corazón de forma natural. (Muestras fecales obtenidas de animales caninos que tienen una infección por gusano derivada naturalmente se denominan en lo sucesivo como que son muestras fecales de “campo”). A diferencia de los animales caninos beagle de los Experimentos 1 y 2, todos los cuales se produjeron según las mismas condiciones controladas, los animales caninos de los Experimentos 3 y 4 fueron de razas variadas y no se produjeron según las mismas condiciones controladas (por ejemplo, sus dietas variaron). Además, dado que estos animales desarrollaron infección naturalmente, se desconoce qué día después de la infección se tomaron aquellas muestras fecales de campo obtenidas de estos animales. En todos los casos salvo para el gusano del corazón, la infección se confirmó por observación microscópica de huevos de gusano en muestras fecales obtenidas de los animales caninos. Cuando se usó detección microscópica de huevos como procedimiento de diagnóstico de la infección, los canes que producen muestras fecales que estuvieron libres de huevos de gusano se consideraron que estaban sin infectar. La infección por gusano del corazón se confirmó usando el kit de prueba de antígeno de gusano del corazón SNAP®, que está comercialmente disponible de IDEXX Laboratories, Inc. de Westbrook, ME, según el protocolo recomendado por el fabricante.

Anticuerpo anti-Ac-ASP-5. La proteína ASP-5 de *Ancylostoma caninum* (n.º de acceso: AY217006; Zhan y col. (Int. J. Parasitol. (2003), vol. 33, pág. 897) se expresó como una proteína de longitud completa sin la secuencia señal del extremo N y se purificó según procedimientos convencionales conocidos en la técnica. La proteína ASP-5 purificada se usó para inmunizar conejos, según procedimientos convencionales conocidos en la técnica, para producir antisuero de conejo anti-Ac-ASP-5. El anticuerpo IgG se aisló del antisuero de conejo anti-Ac-ASP-5, usando purificación en proteína G según procedimientos bien conocidos en la técnica, para producir anti-Ac-ASP-5 pAB.

Ensayos de ELISA. Anti-Ac-ASP-5 pAB de conejo purificado en proteína G (5 µg/ml; 100 µl/pocillo) se inmovilizó por adsorción física sobre placas de 96 pocillos Immulon 1B durante la noche a 4 °C. Después las placas se bloquearon con BSA al 1 % en Tris 0,1 M a pH 7,0 a 4 °C durante la noche, seguido de secado a temperatura ambiente. Aproximadamente 100 µl de extracto fecal se añadieron a cada pocillo y se dejó que se incubaran a temperatura ambiente durante una hora. El extracto fecal se preparó suspendiendo 1 g de material fecal sólido en 4 ml de disolución de diluyente (“disolución de diluyente” es base Tris 0,05 M; EDTA 1 mM; Kathon al 0,45 %; 16 mg/ml de sulfato de gentamicina; Tween-20 al 0,05 %; suero bovino fetal al 40 %; suero de conejo al 10 %; y suero de ratón al 5 %). La suspensión se centrifugó a 4000 rpm durante 20 minutos para producir un primer sobrenadante. El primer sobrenadante se centrifugó a 12000 rpm durante 5 minutos para producir un segundo sobrenadante, que se denomina en el presente documento como “extracto fecal”. Los pocillos se lavaron cinco veces con una disolución de PBS-Tween-20 según procedimientos convencionales conocidos para los expertos habituales en la técnica. En un procedimiento separado, el anti-Ac-ASP-5 pAB de conejo purificado en la proteína G se marcó con HRP usando (SMCC) para crear un conjugado. 1-10 µg/ml de este conjugado se añadieron a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Tras un periodo de incubación de 30' a temperatura ambiente, el conjugado sin unir se lavó de los pocillos usando disolución de PBS-Tween-20 según procedimientos convencionales conocidos para aquellos expertos habituales en la técnica. Después se añadieron a cada pocillo 50 µl de sustrato de peroxidasa TMBLUE® (SeraCare Life Sciences, West Bridgewater, MA) según procedimientos convencionales conocidos para aquellos expertos habituales en la técnica y las placas se incubaron durante 10' a temperatura ambiente. Después de detenerse cada reacción enzimática con dodecilsulfato de sodio al 0,1

% (SDS) siguiendo el periodo de incubación de 10', el valor de DO de cada pocillo de la placa de 96 pocillos se midió a A650 por técnicas espectrofotométricas convencionales usando un lector de placas de ELISA.

Experimento 1

5 Anti-Ac-ASP-5 pAB se une específicamente a coproantígenos caninos de anquilostoma.

10 Fue un objetivo del Experimento 1 determinar si anti-Ac-ASP-5 pAB se une específicamente o no a coproantígenos de anquilostoma. Las determinaciones de DO individuales para 12 muestras fecales caninas obtenidas en el Experimento 1 se muestran en la FIG. 2. Estas muestras fecales se obtuvieron de cinco animales caninos que se sabía que estaban libres de infección por gusano parasitario (TIY5, RCZ5, LCZ5, SVY5 y SBY5) y de cinco animales caninos que se sabía que estaban infectados con anquilostoma (SKZ5, RKY5, SXZ5, LEY5 y OGY5). Específicamente, las muestras fecales se obtuvieron en el día 31 después de la infección ("D31") para cada uno de los cinco canes infectados por anquilostoma. Las muestras fecales se obtuvieron de cada uno de los canes sin infectar un día antes de la infección de los canes infectados por anquilostoma ("D-1") y las muestras fecales se obtuvieron adicionalmente de dos de los canes sin infectar, SVY5 y SBY5, 31 días ("D31") después de la infección de los canes infectados por anquilostoma. La observación microscópica de las muestras fecales probadas en el Experimento 1 mostró que los huevos de anquilostoma estuvieron sustancialmente presentes en los cinco canes infectados por anquilostoma, pero no estuvieron presentes en ninguna de las muestras fecales tomadas de los canes sin infectar.

20 Los valores de DO medidos de cada una de las dos muestras fecales sin infectar en el día 31 después de la infección fueron 0,063. En cambio, la DO promedio medida de las cinco muestras fecales infectadas por anquilostoma en el día 31 después de la infección fue 0,750 (los valores de DO de estas muestras oscilaron de 0,309 a 1,083), que fue aproximadamente 12 veces superior al valor de DO de 0,063 medido para cada una de las muestras sin infectar. Estos datos indican que anti-Ac-ASP-5 pAB se une específicamente a uno o más coproantígenos en animales caninos infectados por anquilostoma, pero no se une específicamente a ningún coproantígeno en animales caninos sin infectar. Por tanto, estos datos indican que anti-Ac-ASP-5 pAB puede usarse para detectar la presencia o ausencia de infección por anquilostoma en un animal canino.

30 Experimento 2

Anti-Ac-ASP-5 pAB detecta coproantígenos de anquilostoma ya entre nueve días y 13 días después de la introducción de infección por anquilostoma al can; anti-Ac-ASP-5 pAB detecta coproantígenos de anquilostoma solo en aquellas veces cuando el animal canino tiene una infección por anquilostoma activa; y anti-Ac-ASP-5 pAB no se une específicamente a coproantígenos de ascáride o tricocéfalos.

40 Fue un objetivo del Experimento 2 determinar cómo de pronto después de la infección anti-Ac-ASP-5 pAB puede detectar coproantígenos de anquilostoma en comparación con el procedimiento de flotación fecal convencional de oro anteriormente mencionado. Además, fue un segundo objetivo del Experimento 2 determinar si anti-Ac-ASP-5 pAB detecta infección por anquilostoma en un animal solo en momentos apropiados (es decir, solo cuando un animal tiene una infección por anquilostoma activa). Incluso además, fue un tercer objetivo del Experimento 2 determinar si anti-Ac-ASP-5 pAB detecta coproantígenos de ascáride y/o de tricocéfalos.

45 Los valores de DO medidos para muestras fecales obtenidas de canes infectados por anquilostoma y canes sin infectar se muestran en las FIGS. 3 y 4, respectivamente. Específicamente, la FIG. 3 muestra valores de DO promedio (y desviaciones estándar) generadas usando muestras fecales tomadas de canes infectados por anquilostoma durante el transcurso de 112 días. (Cada valor de DO mostrado en la FIG. 3 es el promedio de seis valores de DO generados a partir de la misma muestra fecal en seis reacciones de ELISA separadas). Los datos de los mismos cinco animales caninos se muestran para los días -1 (es decir, un día antes de la administración de infección por anquilostoma a los animales) y 87 y para días seleccionados entremedias. Los datos de tres de estos cinco canes se muestran para los días 93 y 111 y para días seleccionados entremedias.

50 La FIG. 4 muestra valores de DO promedio (y desviaciones estándar) medidos usando muestras fecales de canes sin infectar durante el transcurso de 108 días. (Cada valor de DO mostrado en la FIG. 4 es el promedio de seis valores de DO obtenidos de la misma muestra fecal en seis reacciones de ELISA separadas). Los datos de los mismos cinco canes sin infectar se muestran para los días -1 (es decir, un día antes de la administración de infección por anquilostoma a los animales infectados por anquilostoma) y 87 y para días seleccionados entremedias. Los datos de tres de estos cinco canes se muestran para cada uno de los días 93, 100 y 107.

60 Con referencia a la FIG. 3, el promedio de los valores de DO promedio medidos para los canes infectados por anquilostoma fue 0,067 en el día 2 después de la infección (como se muestra en la FIG. 4, el promedio de los valores de DO promedio medidos para los animales sin infectar en ese mismo día fue 0,068). En el día 9 después de la infección, el promedio del valor de DO promedio medido para los canes infectados por anquilostoma aumentó a 0,143, que fue más de dos veces superior al promedio de los valores de DO promedio medidos para los animales sin infectar en ese mismo día (0,066; véase la FIG. 4). En el día 13 después de la infección, el promedio de los valores de DO promedio medidos para los canes infectados por anquilostoma aumentó a 0,379, que fue superior a cinco veces superior al promedio de los

valores de DO promedio medidos para los animales sin infectar caninos en el día 9 (0,066; véase la FIG. 4) y día 17 (0,075; véase la FIG. 4). Además, huevos de anquilostoma aparecieron por primera vez en las muestras fecales obtenidas de los animales caninos infectados por anquilostoma en el día después de la infección 17. Por tanto, el Experimento 2 indica que anti-Ac-ASP-5 pAB detectó coproantígenos de anquilostoma en animales caninos infectados por anquilostoma ya entre nueve días y 13 días después de la infección y por tanto detectaron estos coproantígenos al menos cuatro días antes de que los huevos de anquilostoma aparecieran por primera vez en las heces de los canes infectados por anquilostoma.

Para los días 13 a 87 después de la infección, los valores de DO promedio generados a partir de los animales caninos infectados por anquilostoma fueron varias veces superiores a los valores de DO promedio generados a partir de los animales sin infectar durante ese mismo periodo. (Para cada día de prueba durante ese periodo, el promedio del valor de DO promedio medido para los canes infectados por anquilostoma fue 0,496 o superior, mientras que el promedio de los valores de DO promedio medidos para los animales sin infectar fue 0,093 o inferior). Este resultado estuvo de acuerdo con los resultados obtenidos en el Experimento 1 y respaldan adicionalmente la conclusión del Experimento 1 de que anti-Ac-ASP-5 pAB puede usarse para la presencia o ausencia de infección por anquilostoma en un animal canino.

La observación microscópica de la muestra fecal tomada de los animales caninos infectados por anquilostoma en el día 93 después de la infección mostró que la muestra estaba moderadamente libre de huevos de anquilostoma y la observación microscópica de las muestras fecales tomadas de los animales infectados por anquilostoma en los días 97 después de la infección y más adelante mostró que las muestras estaban sustancialmente libres de huevos de anquilostoma. Se espera que la reducción moderada en huevos en el día después de la infección 93 y la sustancial reducción en huevos en el día 97 después de la infección y más adelante se deba al tratamiento antihelmíntico administrado en el día 91 después de la infección. Con referencia a la FIG. 3, el promedio de los valores de DO promedio medidos para los canes infectados por anquilostoma estuvo de acuerdo con la reducción observada del número de huevos en las muestras fecales tomadas de estos animales. Específicamente, el promedio del valor de DO promedio medido para estos canes en los días siguientes al tratamiento antihelmíntico osciló de 0,70 a 0,260. (El mayor valor de DO promedio, es decir, el valor de 0,260, se midió para las muestras fecales del día 93 después de la infección, que se tomaron solo dos días después de la administración del antihelmíntico cuando una cantidad moderada de huevos estaba todavía presente en las heces). Estos valores fueron varias veces inferiores al promedio de los valores de DO promedio medidos en el día 87 después de la infección (0,619), que fue el último día en el que las muestras fecales se probaron antes de la administración de antihelmíntico. El promedio de los valores de DO promedio medidos para los animales caninos sin infectar durante este mismo periodo fue 0,082 o menos.

Por tanto el Experimento 2 indica adicionalmente que anti-Ac-ASP-5 pAB detectó fuertemente coproantígenos de anquilostoma cuando un animal portador se infectó sustancialmente con anquilostoma, detectó débilmente coproantígenos de anquilostoma cuando un animal portador se infectó moderadamente por anquilostoma y no detectó coproantígenos de anquilostoma cuando un animal portador estuvo sustancialmente libre de infección por anquilostoma.

Las determinaciones de DO para muestras fecales obtenidas de animales caninos infectados por ascáride y animales caninos infectados por tricocéfalo se muestran en las FIG. 5 y 6, respectivamente. Específicamente, la FIG. 5 muestra valores de DO promedio (y desviaciones estándar) generados usando muestras fecales tomadas de canes infectados por ascáride durante el transcurso de 112 días y la FIG. 6 muestra valores de DO promedio (y desviaciones estándar) generados usando muestras fecales tomadas de canes infectados por tricocéfalo durante el transcurso de 112 días. (En las FIGS. 5 y 6, cada valor de DO mostrado es el promedio de seis valores de DO generados a partir de la misma muestra). Los datos de los mismos cinco canes infectados por ascáride y de los mismos cinco canes infectados por tricocéfalo se muestran para los días -1 (es decir, un día antes de la administración de infección por anquilostoma a los animales) y 87 y para los días seleccionados entremedias. Los datos de tres de los cinco canes infectados por ascáride y de tres de los cinco canes infectados por tricocéfalo se muestran para los días 93 y 111 y para los días seleccionados entremedias.

Con referencia continua a las FIG. 5 y 6, el promedio de los valores de DO promedio medidos para los canes infectados por ascáride e infectados por tricocéfalo fue coherentemente 0,102, o menos para los canes infectados por ascáride e inferior a 0,100 para los canes infectados por tricocéfalo durante todo el periodo de prueba. En cada caso, estos valores son varias veces inferiores al promedio de los valores de DO promedio medidos para los canes infectados por anquilostoma durante el periodo correspondiente.

Estos datos indican que anti-Ac-ASP-5 pAB no se une específicamente a ningún coproantígeno en canes infectados por ascáride o infectados por tricocéfalo. Por tanto, anti-Ac-ASP-5 pAB puede usarse para confirmar la presencia o ausencia de infección por anquilostoma en un animal canino independientemente de si ese animal está infectado o no por cualquiera o ambos de ascáride y tricocéfalo.

Experimento 3

Anti-Ac-ASP-5 pAB no se une específicamente a coproantígeno de céstodo y anti-Ac-ASP-5 pAB se une a anquilostoma en muestras fecales de campo.

Fue un objetivo del Experimento 3 determinar si anti-Ac-ASP-5 pAB se une o no específicamente a coproantígeno de céstodo. Fue un segundo objetivo del Experimento 3 determinar si anti-Ac-ASP-5 pAB se une o no específicamente a coproantígeno de uno o más de anquilostoma, ascáride, tricocéfalo y céstodo en muestras fecales caninas de campo. Determinaciones de DO individuales para muestras fecales de campo obtenidas de animales caninos infectados por anquilostoma, infectados por ascáride, infectados por tricocéfalo, infectados por céstodo y sin infectar se muestran en la FIG. 7. Los valores de DO medidos para los animales caninos infectados por anquilostoma, que promediaron 0,871 (y oscilaron de 0,274 a 1,388), fueron varias veces superiores a los valores de DO medidos para los animales caninos infectados por ascáride, infectados por tricocéfalo y sin infectar. Específicamente, el valor de DO promedio medido para los animales caninos infectados por ascáride fue 0,241, el valor de DO promedio medido para los animales caninos infectados por tricocéfalo fue 0,180 y el valor de DO promedio medido para los animales caninos sin infectar fue 0,184. Además, los valores de DO medidos para los animales caninos infectados por anquilostoma fueron más de cuatro veces superiores al valor de DO generado para los canes infectados por céstodo incluidos en este Experimento (específicamente, el valor de DO del animal canino infectado por céstodo fue 0,217).

Estos datos respaldan adicionalmente la conclusión de que anti-Ac-ASP-5 pAB no se une específicamente a ningún coproantígeno en animales caninos infectados por ascáride o animales caninos infectados por tricocéfalo. Estos datos también indican que anti-Ac-ASP-5 pAB no se une específicamente a ningún coproantígeno de céstodo. Estos datos indican adicionalmente que anti-Ac-ASP-5 pAB se une específicamente a antígeno de anquilostoma en muestras fecales de campo de animales caninos infectados por anquilostoma. La observación de que anti-Ac-ASP-5 pAB se une específicamente a antígeno de anquilostoma en muestras fecales de campo de animales caninos infectados por anquilostoma es significativa debido a que confirma que anti-Ac-ASP-5 pAB es capaz de detectar anquilostoma en muestras fecales obtenidas de canes de razas variadas y de dietas variadas.

Experimento 4

Anti-Ac-ASP-5 pAB no se une específicamente a coproantígeno de gusano del corazón.

Fue un objetivo del Experimento 4 determinar si anti-Ac-ASP-5 pAB se une o no específicamente a coproantígeno de gusano del corazón. Las determinaciones de DO para 11 muestras fecales de campo caninas se muestran en la FIG. 8. Específicamente, la FIG. 8 muestra valores de DO individuales medidos para muestras fecales de cuatro animales caninos que se sabe que están libres de infección por gusanos parasitarios (LCZ5, RCZ5, SBY5 y TIY5), un animal canino que se sabe que está infectado por anquilostoma (LEY5) y siete animales caninos que se sabe que están infectados por gusano del corazón (403, 404, 405, 406, 583, 749 y 868).

El valor de DO promedio medido para las muestras sin infectar fue 0,090 (con un intervalo de 0,077 a 0,109), mientras que el valor de DO promedio obtenido de las muestras infectadas por gusano del corazón fue 0,125 (con un intervalo de 0,88 a 0,267). El único valor de DO medido para los canes infectados por anquilostoma fue 1,074, que fue más de 10 veces superior al valor de DO promedio medido para las muestras sin infectar y casi nueve veces superior al valor de DO promedio medido para las muestras infectadas por el gusano del corazón y está de acuerdo con otros valores de DO obtenidos para muestras infectadas por anquilostoma descritas en el presente documento. Tomados conjuntamente, estos datos respaldan la conclusión de que anti-Ac-ASP-5 pAB se une específicamente a coproantígenos en muestras fecales infectadas por anquilostoma, no se une específicamente a coproantígeno en muestras fecales sin infectar y adicionalmente muestra que anti-Ac-ASP-5 pAB no se une específicamente a coproantígenos de gusano del corazón. Adicionalmente, estos datos confirman adicionalmente que anti-Ac-ASP-5 pAB se une específicamente a antígeno de anquilostoma en muestras fecales de campo de animales caninos infectados por anquilostoma.

Aunque los dispositivos, procedimientos y kits de la presente invención se han descrito con respecto a una realización específica y a un ejemplo específico, debe entenderse que pueden hacerse variaciones al dispositivo y/o al procedimiento de la presente invención sin apartarse del alcance de la invención. Por ejemplo, mientras que anti-Ac-ASP-5 pAB se produjo en conejo contra ASP5 recombinante purificada, el anticuerpo policlonal también puede producirse en, por ejemplo, un ser humano u otro primate, ratón, rata, cobaya, cabra, cerdo, vaca, oveja, burro, perro, gato, pollo o caballo. Un anticuerpo usado en la invención también puede ser cualquier clase de anticuerpo incluyendo, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Dean, *Methods Mol. Biol.* 80: 23-37 (1998); Dean, *Methods Mol. Biol.* 32: 361-79 (1994); Baileg, *Methods Mol. Biol.* 32: 381-88 (1994); Gullick, *Methods Mol. Biol.* 32: 389-99 (1994); Drenckhahn y col., *Methods Cell. Biol.* 37: 7-56 (1993); Morrison, *Ann. Rev. Immunol.* 10: 239-65 (1992); Wright y col., *Crit. Rev. Immunol.* 12: 125-68 (1992). Además, debe entenderse que el anticuerpo policlonal no necesita producirse contra ASP5 recombinante. Por tanto, el anticuerpo policlonal puede producirse contra ASP5 que se produce de forma natural. Procedimientos de aislamiento de proteínas que se producen en la naturaleza se conocen bien en la técnica. Véase, por ejemplo, Cutler, *Protein Isolation Protocols*, 2ª ed., Humana Press (2003); Bollag y col., *Protein Methods*, 2ª ed., Wiley-Liss Publishers (1996).

Un anticuerpo usado en los dispositivos, procedimientos y kits de la invención también puede ser un anticuerpo monocatenario (scFv), o un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo. Fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno son una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable de un

anticuerpo intacto, en el que la porción está libre de los dominios de cadena pesada constante de la región Fc del anticuerpo intacto. Ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y F_v.

5 Los anticuerpos usados en los dispositivos, procedimientos y kits de la invención pueden inmovilizarse sobre el soporte sólido por cualquier metodología conocida en la técnica, que incluye, por ejemplo, unir covalentemente o no covalentemente, directamente o indirectamente, los anticuerpos al soporte sólido. Por tanto, mientras que anti-Ac-ASP-5 pAB se une al soporte sólido por adsorción física (es decir, sin el uso de engarces químicos) en la realización descrita, se contempla que anti-Ac-ASP-5 pAB u otros anticuerpos pueden inmovilizarse al soporte sólido por cualquier procedimiento de unión química (es decir, con el uso de engarces químicos) fácilmente conocido para experto habitual en la técnica.

15 El soporte sólido del dispositivo no se limita a ser una placa de 96 pocillos de poliestireno. El soporte sólido puede ser cualquier material adecuado para la inmovilización de anticuerpos específicos para anquilostoma. Por ejemplo, el soporte sólido puede ser perlas, partículas, tubos, pocillos, sondas, tiras reactivas, puntas de pipeta, portaobjetos, fibras, membranas, papeles, celulosas naturales y modificadas, poli(acrilamidas, agarosas, vidrio, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, plásticos, magnetita o cualquier otro material adecuado fácilmente conocido para un experto habitual en la técnica.

20 El dispositivo de la presente invención puede ser uno que sea adecuado para realizar un ensayo de flujo lateral. Un dispositivo a modo de ejemplo que es útil para realizar un ensayo de flujo lateral que es útil en la presente invención se describe en la patente de EE.UU. n.º: 5.726.010. Por tanto el dispositivo para realizar un ensayo de flujo lateral puede ser un dispositivo SNAP®, que está comercialmente disponible de IDEXX Laboratories, Inc. de Westbrook, ME.

25 El dispositivo puede incluir opcionalmente uno o más reactivos de captura de antígeno marcados que pueden mezclarse con una muestra fecal antes de la aplicación a un dispositivo de la invención. Cuando el reactivo de antígeno marcado se incluye, el reactivo de captura de antígeno marcado puede o puede no depositarse o secarse sobre la superficie sólida del dispositivo. "Captura de antígeno" significa cualquier compuesto que es específico para el antígeno de interés. El reactivo de captura de antígeno marcado, tanto si se añade a una muestra fecal o si se deposita previamente sobre el dispositivo, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo marcado específico para un antígeno de anquilostoma. Por ejemplo, un anticuerpo específico para anquilostoma conjugado con peroxidasa de rábano picante puede usarse como un reactivo de captura de antígeno marcado.

35 El dispositivo también puede incluir opcionalmente un reactivo líquido que transporta, tal como cuando el dispositivo incluye el dispositivo SNAP®, por ejemplo, o facilita la eliminación de, tal como cuando el dispositivo incluye una placa de 96 pocillos, por ejemplo, material sin unir (por ejemplo, muestra fecal sin reaccionar y reactivo de captura de antígeno sin unir) lejos de la zona de reacción (fase sólida). El reactivo líquido puede ser un reactivo de lavado y servir solo para eliminar material sin unir de la zona de reacción, o puede incluir un reactivo detector y servir tanto para eliminar material sin unir como facilitar la detección del antígeno. Por ejemplo, en el caso de un reactivo de captura de antígeno conjugado con una enzima, el reactivo detector incluye un sustrato que produce una señal detectable tras la reacción con el conjugado de enzima-anticuerpo en la zona de reacción (fase sólida). Alternativamente, en el caso de un reactivo de captura de antígeno marcado conjugado con una molécula radiactiva, fluorescente o que absorbe luz, el reactivo detector actúa simplemente como una disolución de lavado facilitando la detección de la formación de complejos en la zona reactiva lavando reactivo marcado sin unir.

45 El reactivo líquido puede incluir adicionalmente una cantidad limitada de un "inhibidor", es decir, una sustancia que bloquea el desarrollo del producto final detectable. Una cantidad limitada se define como que es una cantidad de inhibidor suficiente para bloquear el desarrollo del producto final hasta que la mayoría o todo el exceso de material sin unir se transporte lejos de la segunda región, en cuyo momento se produce producto final detectable.

50 El dispositivo de la presente invención también puede incluir diversos reactivos de unión inmovilizados en localizaciones distintas del (de los) reactivo(s) de captura de antígeno. Por ejemplo, un inmunoreactivo (un anticuerpo, antígeno o péptido) que reconoce una porción de anticuerpo específica para especie (por ejemplo, específica para gusano) de un anticuerpo marcado o reactivo de captura de antígeno o una porción enzimática de un reactivo marcado con enzima puede incluirse como control positivo para evaluar la viabilidad de los reactivos dentro del dispositivo. Por ejemplo, un control positivo puede ser un anticuerpo anti-peroxidasa de rábano picante que se ha producido en, por ejemplo, una cabra o un ratón. Adicionalmente, un reactivo, por ejemplo, un anticuerpo, aislado de un miembro no inmune de la especie de la que se derivó la porción de anticuerpo del complejo de antígeno-anticuerpo puede incluirse como un control negativo para evaluar la especificidad de formación del inmunocomplejo (es decir, complejo de antígeno-anticuerpo).

60 Además de diseñarse para detectar anquilostoma en una muestra fecal, el dispositivo de la invención puede diseñarse opcionalmente para permitir que se realicen una o más de otras pruebas de diagnóstico. Por ejemplo, el soporte sólido también puede incluir reactivos para la detección de uno o más parásitos gusanos no anquilostoma, uno o más parásitos no gusanos, uno o más virus o una o más bacterias. Los reactivos para la detección de uno o más parásitos gusanos no anquilostoma, uno o más parásitos no gusanos, uno o más virus o una o más bacterias pueden ser, por ejemplo, uno o

más anticuerpos o uno o más antígenos reconocidos por anticuerpos específicos para uno o más parásitos gusanos no anquilostoma, uno o más parásitos no gusanos, uno o más virus o una o más bacterias.

5 En el procedimiento de la presente invención, la detección de una infección por anquilostoma se lleva a cabo detectando la presencia o ausencia de uno o más antígenos de anquilostoma en una muestra fecal. La porción soluble de una muestra fecal que va a probarse puede recogerse por cualquier protocolo conocido en la técnica. Por ejemplo, además del protocolo específico descrito anteriormente, las porciones solubles de la muestra pueden recogerse usando filtración, centrifugación, o mezcla simple seguida de sedimentación gravimétrica.

10 El procedimiento incluye poner en contacto la muestra fecal con uno o más anticuerpos específicos para uno o más antígenos de anquilostoma en condiciones que permitan que se forme un complejo de antígeno/anticuerpo, es decir, un inmunocomplejo. Es decir, un anticuerpo se une específicamente a un antígeno de anquilostoma presente en la muestra fecal. Un experto habitual en la técnica estaría familiarizado con ensayos y condiciones que se usan para detectar la unión del complejo de antígeno/anticuerpo. Por ejemplo, el complejo de antígeno/anticuerpo puede detectarse usando un anticuerpo secundario que se une al complejo de antígeno/anticuerpo. La formación de un complejo entre el antígeno de anquilostoma y los anticuerpos anti-anquilostoma en la muestra puede detectarse usando cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Además, la cantidad de complejos de anticuerpo-antígeno puede determinarse por metodología conocida en la técnica. Un nivel que es superior al formado en una muestra de control indica una infección por anquilostoma.

20 Etapas alternativas del procedimiento de la presente invención pueden incluir aplicar la muestra fecal a un dispositivo de la invención, que incluye un anticuerpo inmovilizado específico para antígeno de anquilostoma y detectar la presencia o ausencia del antígeno de anquilostoma en la muestra fecal. Anticuerpos específicos para antígenos de anquilostoma pueden unirse directamente o indirectamente a un soporte sólido o a un sustrato tal como un pocillo de microtitulación, perla magnética, perla no magnética, columna, matriz, membrana, esterilla fibrosa compuesta de fibras sintéticas o naturales (por ejemplo, vidrio o materiales basados en celulosa o polímeros termoplásticos, tales como, polietileno, polipropileno o poliéster), estructura sinterizada compuesta de materiales particulados (por ejemplo, vidrio o diversos polímeros termoplásticos), o película de membrana colada compuesta de nitrocelulosa, nailon, polisulfona o similares (generalmente de naturaleza sintética). Todos estos materiales de sustrato pueden usarse en formas adecuadas, tales como películas, hojas, o placas, o pueden recubrirse sobre o unirse o laminarse a vehículos inertes apropiados tales como papel, vidrio, películas de plástico o tejidos. Procedimientos adecuados para inmovilizar péptidos sobre fases sólidas incluyen interacciones iónicas, hidrófobas, covalentes y similares.

35 Sin embargo, el procedimiento de la presente invención no necesita incluir el uso de fases sólidas o sustratos. Por ejemplo, los procedimientos pueden incluir procedimientos de inmunoprecipitación que no requieren el uso de fases sólidas o sustratos.

40 En algunas realizaciones de la invención, el complejo de antígeno/anticuerpo se detecta cuando un reactivo indicador, tal como un conjugado enzimático, que está unido al anticuerpo, cataliza una reacción detectable. Opcionalmente, un reactivo indicador que incluye un compuesto que genera señal puede aplicarse al complejo de antígeno/anticuerpo en condiciones que permitan la formación de un complejo de antígeno/anticuerpo/indicador detectable. Opcionalmente, el anticuerpo puede marcarse con un reactivo indicador antes de la formación de un complejo de antígeno/anticuerpo.

45 La formación de un complejo de antígeno/anticuerpo o un complejo de antígeno/anticuerpo/indicador en algunos de los procedimientos de la presente invención puede detectarse específicamente por procedimientos radiométricos, colorimétricos, fluorimétricos, de separación por tamaño, o de precipitación. La detección de un complejo de antígeno/anticuerpo también puede llevarse a cabo mediante la adición de un anticuerpo secundario que se acopla a un reactivo indicador que incluye un compuesto que genera señal. Reactivos indicadores que incluyen compuestos que generan señal (marcas) asociados a un complejo de polipéptido/anticuerpo pueden detectarse usando los procedimientos descritos anteriormente y pueden incluir agentes cromogénicos, catalizadores tales como conjugados enzimáticos, compuestos fluorescentes tales como fluoresceína y rodamina, compuestos quimioluminiscentes tales como dioxetanos, acridinios, fenantridinios, rutenio y luminol, elementos radiactivos, marcas visuales directas, además de cofactores, inhibidores, partículas magnéticas y similares. Ejemplos de conjugados enzimáticos incluyen fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante, beta-galactosidasa y similares. La selección de una marca particular no es crítica, pero será capaz de producir una señal tanto por sí misma como conjuntamente con una o más sustancias adicionales.

60 Los anticuerpos, que incluyen anticuerpos secundarios, pueden marcarse con cualquier tipo de marca conocida en la técnica, que incluyen, por ejemplo, marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, de enzimas, de partículas coloidales, de radioisótopos y bioluminiscentes. En diversas realizaciones de la invención, los uno o más de los anticuerpos de la invención se marcan con una enzima, una partícula coloidal, un radionúclido o un fluoróforo. La marca particulada puede ser, por ejemplo, una partícula de látex coloreada, sol de colorante, o sol de oro conjugado con un anticuerpo específico para un antígeno de anquilostoma.

65 Los procedimientos de la invención incluyen, pero no se limitan a aquellos basados en ensayos de competición, de reacción directa o tipo sándwich, que incluyen, pero no se limitan a, ELISA, transferencias Western, RIA, ensayos inmunofluorescentes (IFA), hemaglutinación (HA), inmunoensayo de polarización por fluorescencia (FPIA) y ensayos en

placa de microtitulación (cualquier ensayo hecho en uno o más pocillos de una placa de microtitulación). Un ensayo de la invención incluye un ensayo de unión cromatográfico de flujo reversible, que puede realizarse, por ejemplo, usando un dispositivo SNAP®. Véase la patente de EE.UU. n.º: 5.726.010.

5 Los procedimientos de la invención facilitan ensayos de sándwich o de unión específica de tipo competición. En un ensayo de sándwich, los reactivos de captura de antígeno se inmovilizan en una zona reactiva. Estos reactivos de captura de antígeno pueden unirse específicamente a antígenos en la muestra fecal que se pone a prueba. Específicamente, estos reactivos de captura de antígeno se unen específicamente a un antígeno de un anquilostoma, si está presente en la muestra fecal. Tras la unión del antígeno de la muestra, el reactivo de captura de antígeno/complejo
10 antigénico se detecta por cualquier procedimiento adecuado. Por ejemplo, el complejo puede hacerse reaccionar con reactivos de unión específica marcados (por ejemplo, un conjugado de enzima-anticuerpo) y detectarse el antígeno (por ejemplo, tras la reacción con sustrato).

15 En otras realizaciones del procedimiento de la presente invención se realiza un ensayo de competición. En un ensayo de competición, los reactivos de captura de antígeno se inmovilizan en la zona reactiva y se ponen en contacto simultáneamente con antígeno de una muestra y antígeno marcado (por ejemplo, un conjugado de antígeno-enzima). La cantidad de marca detectada en la zona reactiva es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

20 En algunas realizaciones de la invención, los anticuerpos específicos para un antígeno o antígenos de anquilostoma se unen a una fase sólida o sustrato. La muestra fecal que incluye potencialmente un antígeno de anquilostoma se añade al sustrato. Se añaden los anticuerpos que se unen específicamente al anquilostoma. Los anticuerpos pueden ser los mismos anticuerpos usados sobre la fase sólida o pueden ser de una fuente o especie diferente. Además, estos anticuerpos pueden ligarse a un reactivo indicador, tal como un conjugado enzimático. Pueden realizarse etapas de lavado antes de cada adición. Puede añadirse un cromóforo o sustrato enzimático y puede permitirse que el color se revele. La reacción de color puede detenerse y el color puede cuantificarse usando, por ejemplo, un espectrofotómetro.
25

30 En otras realizaciones de la invención, los anticuerpos específicos para un antígeno o antígenos de anquilostoma se unen a una fase sólida o sustrato. Una muestra fecal que incluye potencialmente un antígeno de anquilostoma se añade al sustrato. Después se añaden los segundos anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de anquilostomas. Estos segundos anticuerpos pueden o pueden no ser de una especie diferente de la que son los anticuerpos en fase sólida. Después se añaden los terceros anticuerpos anti-especie que se unen específicamente a los segundos anticuerpos y que no se unen específicamente a los anticuerpos en fase sólida. Los terceros anticuerpos pueden incluir un reactivo indicador, tal como un conjugado enzimático. Las etapas de lavado pueden realizarse antes de cada adición. Puede añadirse un cromóforo o sustrato enzimático y puede dejarse que el color se revele. La reacción de color puede detenerse y el color puede cuantificarse usando, por ejemplo, un espectrofotómetro.
35

40 En un ejemplo específico, el procedimiento de la presente invención se realiza conjuntamente con un dispositivo que es un dispositivo de ensayo de flujo lateral añadiendo una muestra fecal preparada a una matriz de flujo del dispositivo en una primera región (una zona de aplicación de muestra). La muestra fecal preparada se lleva en un trayectoria de flujo de fluido por acción capilar a una segunda región de la matriz de flujo donde está una marca particulada capaz de unirse y formar un primer complejo con un antígeno en la muestra fecal. La marca particulada puede ser, por ejemplo, una partícula de látex coloreada, colorante de sol, o sol de oro conjugado con un anticuerpo específico para un antígeno de anquilostoma. El primer complejo se lleva a una tercera región de la matriz de flujo en la que un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno de anquilostoma se inmoviliza en una localización distinta. Un segundo complejo se forma
45 entre el anticuerpo inmovilizado y el primer complejo. La marca particulada que es parte del segundo complejo puede visualizarse directamente.

50 El anticuerpo para anquilostoma puede ser un reactivo de captura de antígeno inmovilizado en una zona de reacción (fase sólida). Un segundo reactivo de captura de antígeno, es decir, un segundo anticuerpo para anquilostoma que se ha conjugado con una marca, bien puede añadirse a la muestra antes de que la muestra se añada al dispositivo, o bien el segundo reactivo de captura de antígeno puede incorporarse en el dispositivo. Por ejemplo, el reactivo de captura de antígeno marcado puede depositarse y secarse sobre una trayectoria de flujo de fluido que proporciona comunicación fluida entre una zona de aplicación de muestras y la fase sólida. El contacto del reactivo de captura de antígeno marcado con la muestra de prueba puede producir la disolución del reactivo de captura de antígeno marcado.
55

60 La invención incluye adicionalmente kits de ensayo (por ejemplo, artículos de fabricación) para detectar anquilostoma en una muestra fecal. Por tanto, un kit incluye uno o más dispositivos de la presente invención. El kit incluye anticuerpos anti-anquilostoma y por ejemplo medios para determinar la unión de los anticuerpos a antígenos de anquilostoma en la muestra. En un ejemplo particular, un kit tal incluye el dispositivo que tiene un anticuerpo anti-anquilostoma inmovilizado, uno o más reactivos de captura de antígeno (por ejemplo, un reactivo de captura de antígeno marcado no inmovilizado y un reactivo de captura de antígeno inmovilizado) y reactivo de lavado, así como reactivo detector y reactivos de control positivo y negativo, si se desea o es apropiado. Otros componentes tales como tampones, controles y similares, conocidos para aquellos expertos habituales en la técnica, pueden incluirse en tales kits de prueba. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden variarse, para mantener concentraciones en disolución de los reactivos que optimizan sustancialmente la sensibilidad del ensayo. Particularmente, los reactivos pueden proporcionarse como polvos secos, normalmente liofilizados, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tiene las
65

5 concentraciones apropiadas para combinar con una muestra. Los anticuerpos, ensayos y kits de la invención son útiles, por ejemplo, en el diagnóstico de casos individuales de infección por anquilostoma en un paciente, además de estudios epidemiológicos de brotes de anquilostomas. El kit puede incluir adicionalmente instrucciones para llevar a cabo uno o más procedimientos de la presente invención, que incluyen instrucciones para usar cualquier dispositivo de la presente invención que se incluya con el kit.

10 Los procedimientos de la invención para la detección de infección por anquilostoma pueden combinarse con otros ensayos de diagnóstico para detectar la presencia de otros organismos o afecciones. Por ejemplo, los ensayos de la invención pueden combinarse con reactivos que detectan uno o más parásitos fecales gusanos no anquilostoma, uno o más parásitos fecales no gusanos, uno o más virus, una o más bacterias, uno o más parásitos transmitidos por la sangre u ocultos en la sangre o una combinación de los mismos. Proporcionando dos o más sitios de unión únicos en un único dispositivo de ensayo (tales como, por ejemplo, dos manchas únicas en un dispositivo de ensayo SNAP®), la presente invención permite la detección de dos o más organismos a partir de una muestra única. En una realización, hay tres
15 manchas únicas para la detección de infección pasada o presente de tres organismos (siendo las manchas bien reactivos de unión a antígenos o bien reactivos de unión a anticuerpos) de una única muestra (es decir, la misma muestra única se presenta a los tres reactivos de captura sobre un único dispositivo).

20 La invención descrita ilustrativamente en el presente documento puede ponerse en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se desvelen específicamente en el presente documento. Así, por ejemplo, en cada caso en el presente documento cualquiera de los términos “que comprende”, “que consiste esencialmente en” y “que consiste en” puede sustituirse con cualquiera de los dos otros términos, mientras que retengan sus significados habituales. Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación y no hay ninguna intención en el uso de tales términos y expresiones de excluir cualquier
25 equivalente de las características mostradas y descritas o partes de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Así, debe entenderse que aunque la presente invención se ha desvelado específicamente por realizaciones preferidas, características opcionales, puede recurrirse a modificación y variación de los conceptos desvelados en el presente documento por aquellos expertos en la técnica y que tales modificaciones y variaciones se considera que están dentro del alcance de esta invención según se define por la descripción y las reivindicaciones adjuntas.

30 Además, si las características o aspectos de la invención se describen en términos de grupos de Markush u otra agrupación de alternativas, aquellos expertos en la técnica reconocerán que la invención también se describe así en términos de cualquier miembro individual o subgrupo de miembros del grupo Markush u otro grupo.

35 Se han descrito varios ejemplos que ayudan a ilustrar la invención. Sin embargo, se entenderá que pueden hacerse diversas modificaciones sin apartarse del alcance de la invención. Por consiguiente, otras realizaciones están dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas a esto.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de detección de la presencia o ausencia de antígeno de anquilostoma en una muestra fecal de un mamífero que comprende:
 - 5 a. poner en contacto la muestra fecal con uno o más anticuerpos específicos para proteína 5 secretada por *Ancylostoma de Ancylostoma caninum* de anquilostomas (ASP5); y
 - b. detectar la presencia o ausencia de uno o más antígenos de anquilostoma o uno o más complejos de anticuerpo/antígeno de anquilostoma.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los uno o más anticuerpos son policlonales.
3. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el mamífero es un can.
- 15 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la muestra fecal está sustancialmente libre de huevos de anquilostoma y la muestra fecal es excretada por el mamífero después de que el mamífero se infecte por anquilostoma.
- 20 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la muestra fecal es excretada por el mamífero no más de 13 días después de de que el mamífero se haya infectado por anquilostoma.
- 25 6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que los uno o más anticuerpos específicos para ASP5 no son capaces de detectar uno o más coproantígenos seleccionados del grupo que consiste en ascáride, tricocéfalo, céstodo y gusano del corazón.
- 30 7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la detección de la presencia o ausencia de uno o más complejos de anticuerpo/antígeno incluye la etapa de proporcionar un anticuerpo secundario que se une al uno o más complejos de anticuerpo/antígeno, preferentemente el anticuerpo secundario está marcado.
- 35 8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que uno o más de los uno o más anticuerpos están marcados.
9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que los uno o más anticuerpos se inmovilizan sobre un soporte sólido.
- 40 10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el soporte sólido forma parte de un dispositivo de ensayo de inmunoabsorción enzimática, preferentemente un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral.
- 45 11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además la etapa de aplicar la muestra a uno o más reactivos para detectar uno o más del grupo que consiste en: uno o más parásitos no anquilostomas, uno o más parásitos no gusanos, uno o más virus y una o más bacterias.
- 50 12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que los uno o más reactivos están seleccionados del grupo que consiste en uno o más anticuerpos o uno o más antígenos reconocidos por anticuerpos específicos para los uno o más parásitos gusanos no anquilostoma, los uno o más parásitos no gusanos, los uno o más virus o las una o más bacterias.
- 55 13. Un dispositivo para detectar la presencia o ausencia de antígeno de anquilostoma en una muestra fecal de un mamífero, comprendiendo el dispositivo un soporte sólido, en los que uno o más anticuerpos específicos para proteína 5 secretada de *Ancylostoma de Ancylostoma caninum* de anquilostomas (ASP5) se inmovilizan sobre el soporte sólido.
- 60 14. El dispositivo de la reivindicación 13, en el que los uno o más anticuerpos son policlonales.
15. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 13 o 14, en el que los uno o más anticuerpos específicos para anquilostoma ASP5 no son específicos para uno o más coproantígenos seleccionados del grupo que consiste en ascáride, tricocéfalo, céstodo y gusano del corazón.
- 65 16. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que uno o más de los uno o más anticuerpos están marcados.
17. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que el dispositivo es un dispositivo de inmunoabsorción enzimática, preferentemente un dispositivo de inmunoensayo de flujo lateral.
18. El dispositivo de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que el dispositivo incluye adicionalmente uno o más reactivos para la detección de uno o más del grupo que consiste en uno o más parásitos gusanos no anquilostoma, uno o más parásitos no gusanos, uno o más virus y una o más bacterias, dichos uno o más reactivos seleccionados del grupo que consiste en uno o más anticuerpos o uno o más antígenos reconocidos por anticuerpos específicos para uno o más parásitos no gusanos, uno o más virus y una o más bacterias.

19. Un kit para la detección de uno o más coproantígenos de anquilostoma en una muestra fecal de un mamífero, comprendiendo el kit el dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 13-18 y uno o más reactivos suficientes para la detección de los uno o más antígenos.

5

20. El kit de la reivindicación 19, en el que los uno o más reactivos están seleccionados del grupo que consiste en uno o más reactivos indicadores, uno o más compuestos de marcado de anticuerpos, uno o más anticuerpos, uno o más reactivos de captura de antígenos, uno o más inhibidores y uno o más reactivos de lavado.

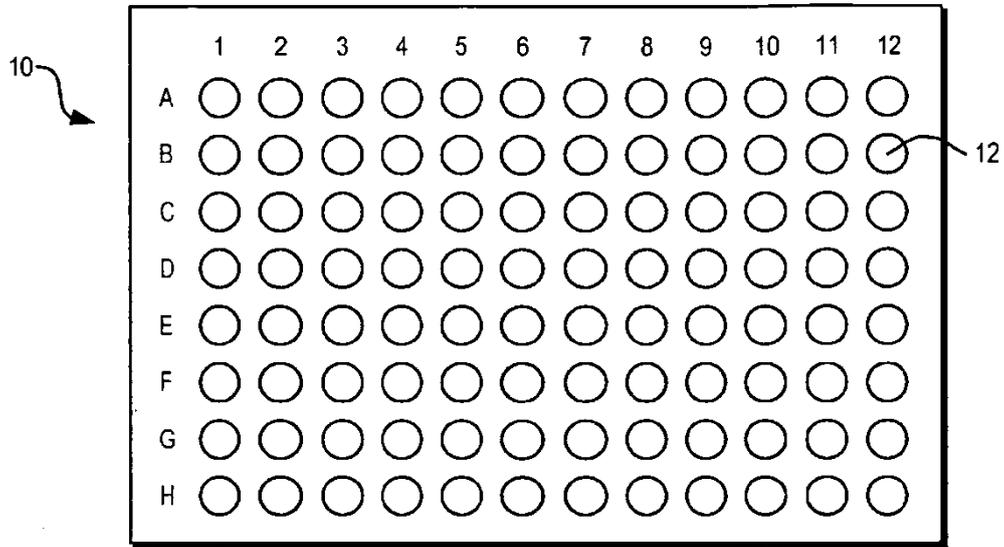


FIG. 1A

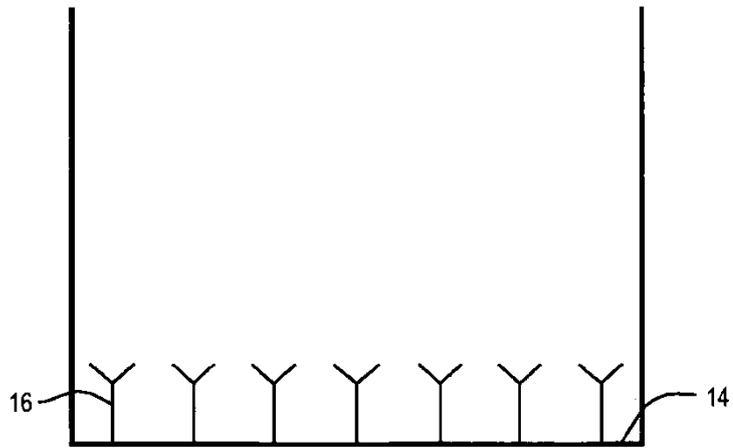


FIG. 1B

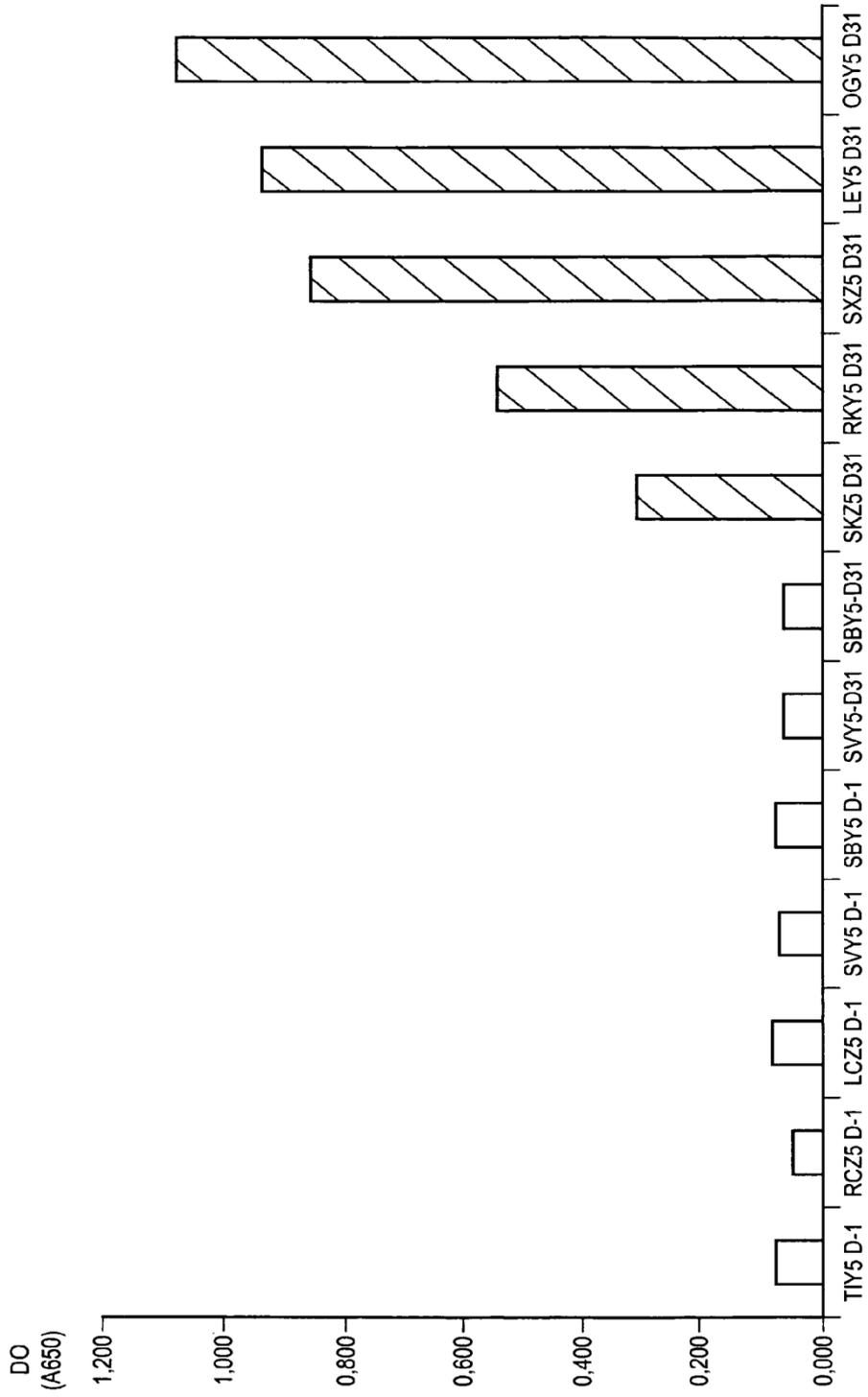
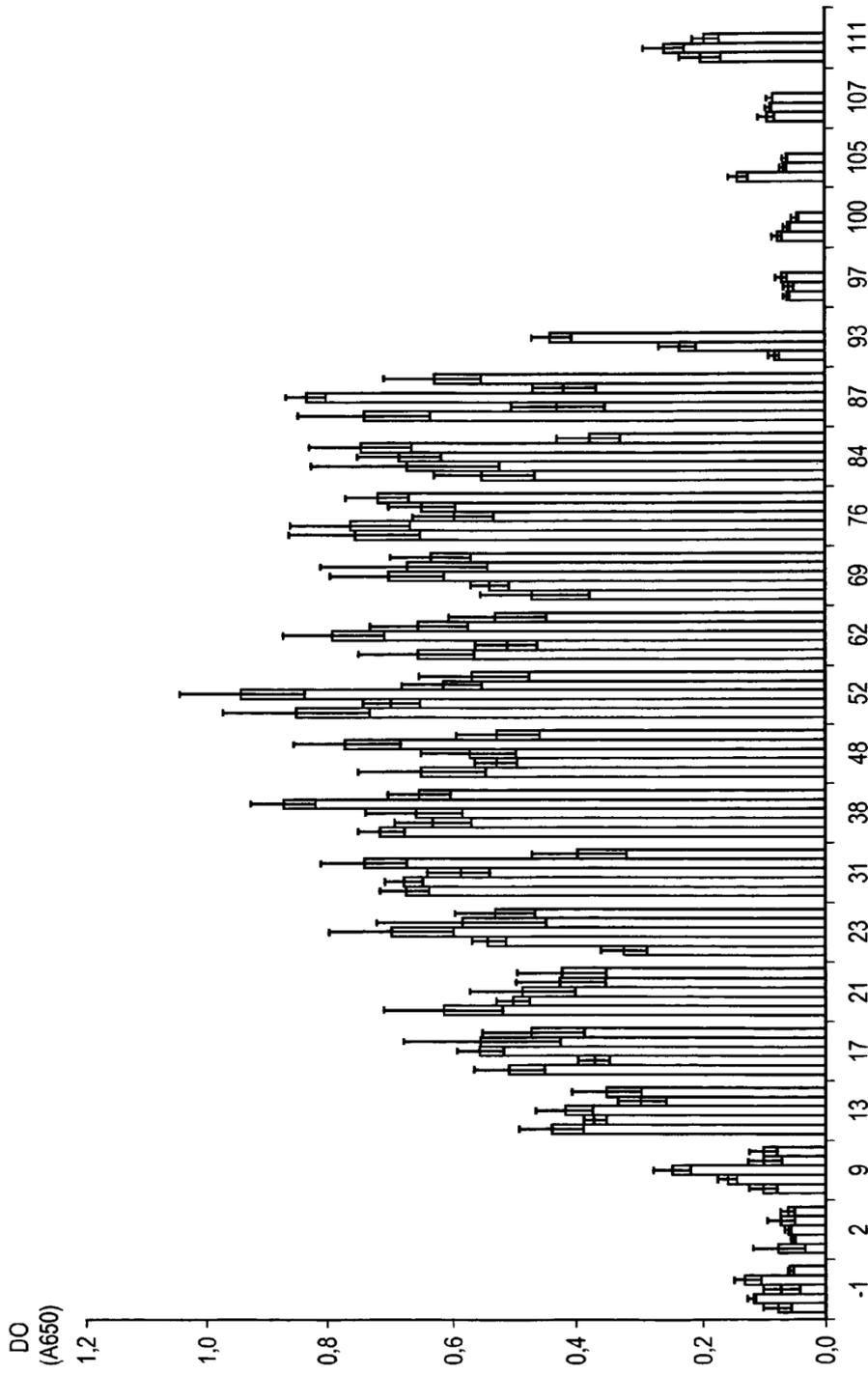


FIG. 2



DÍA DE PRUEBA

FIG. 3

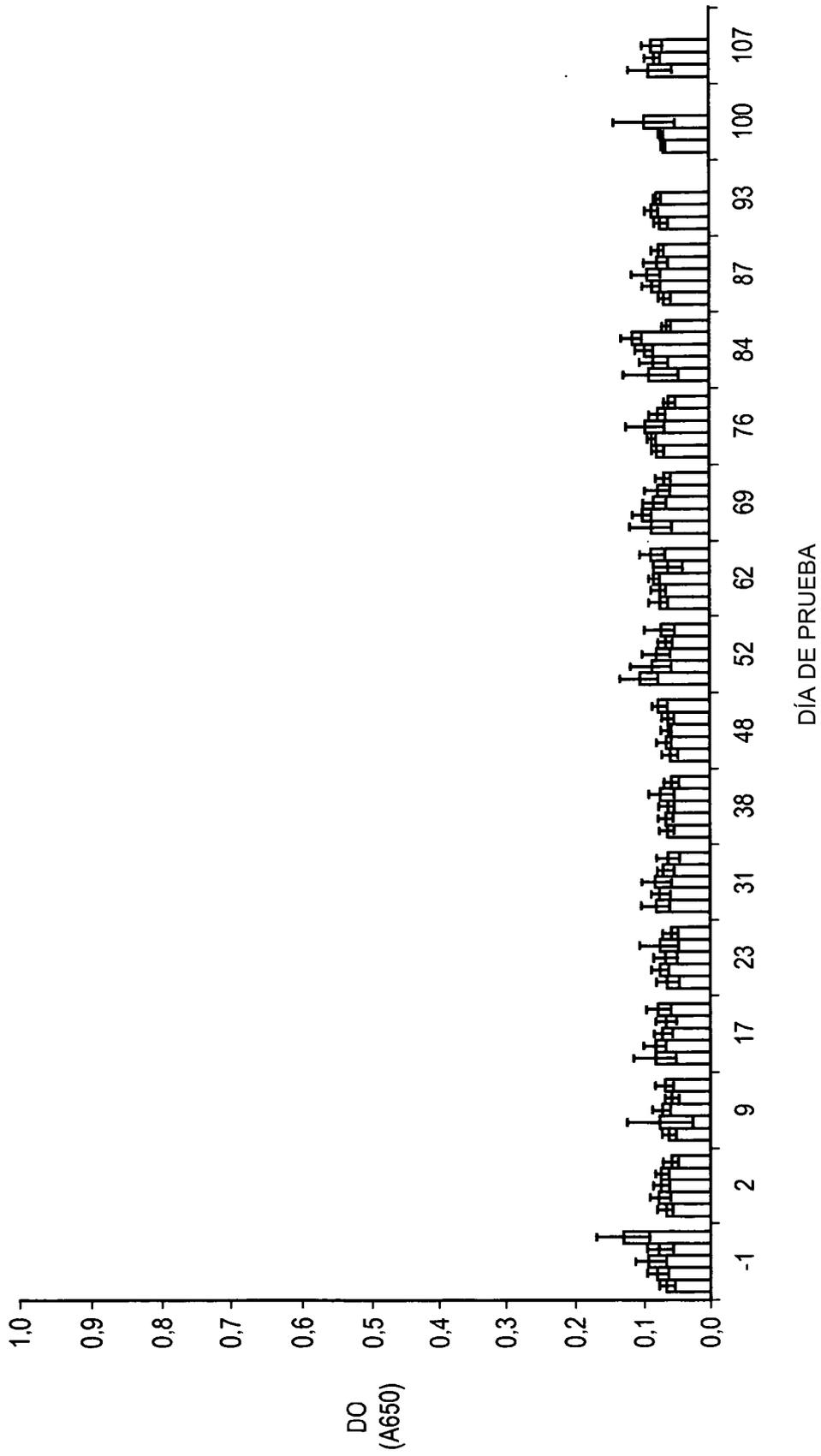


FIG. 4

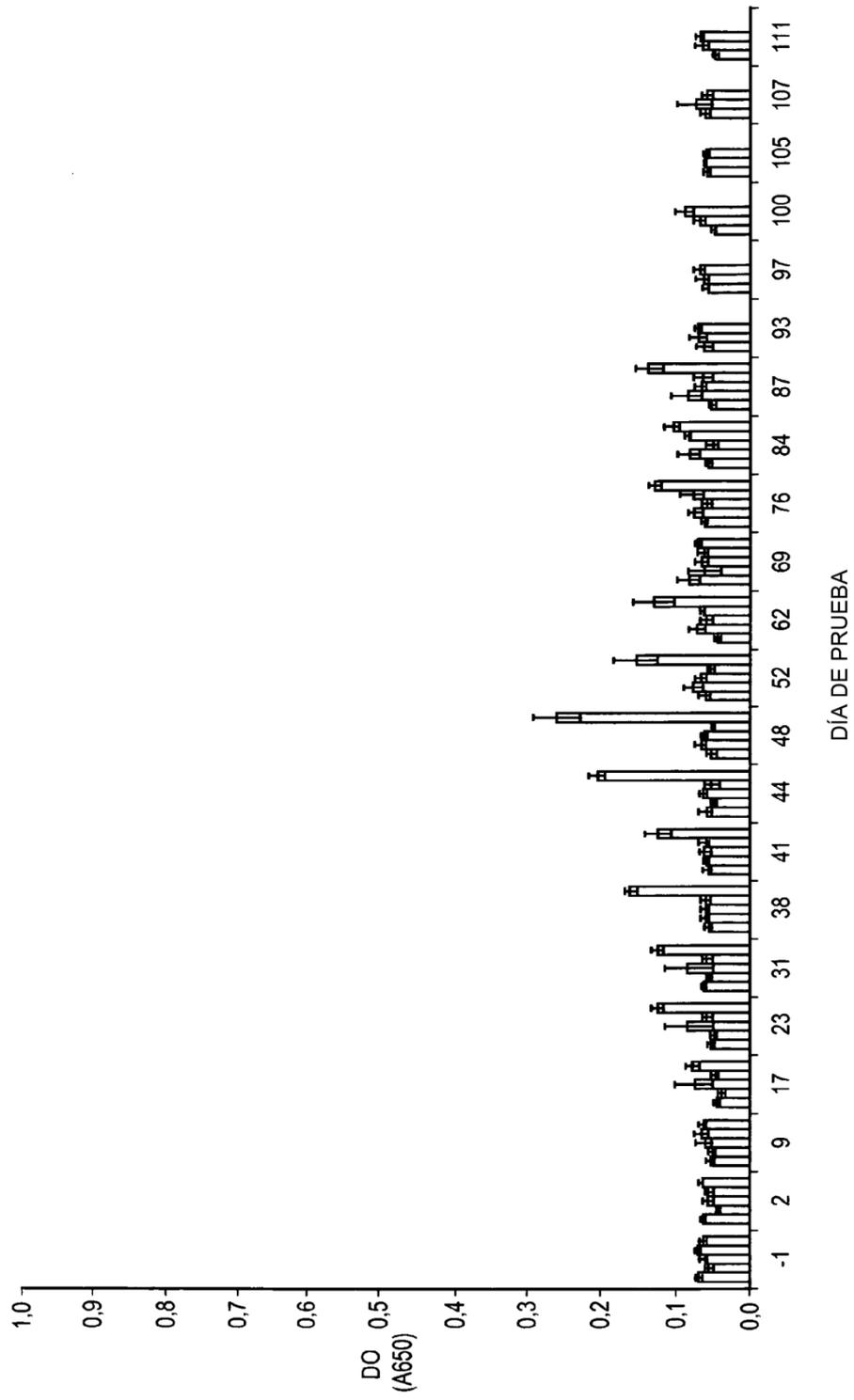


FIG. 5

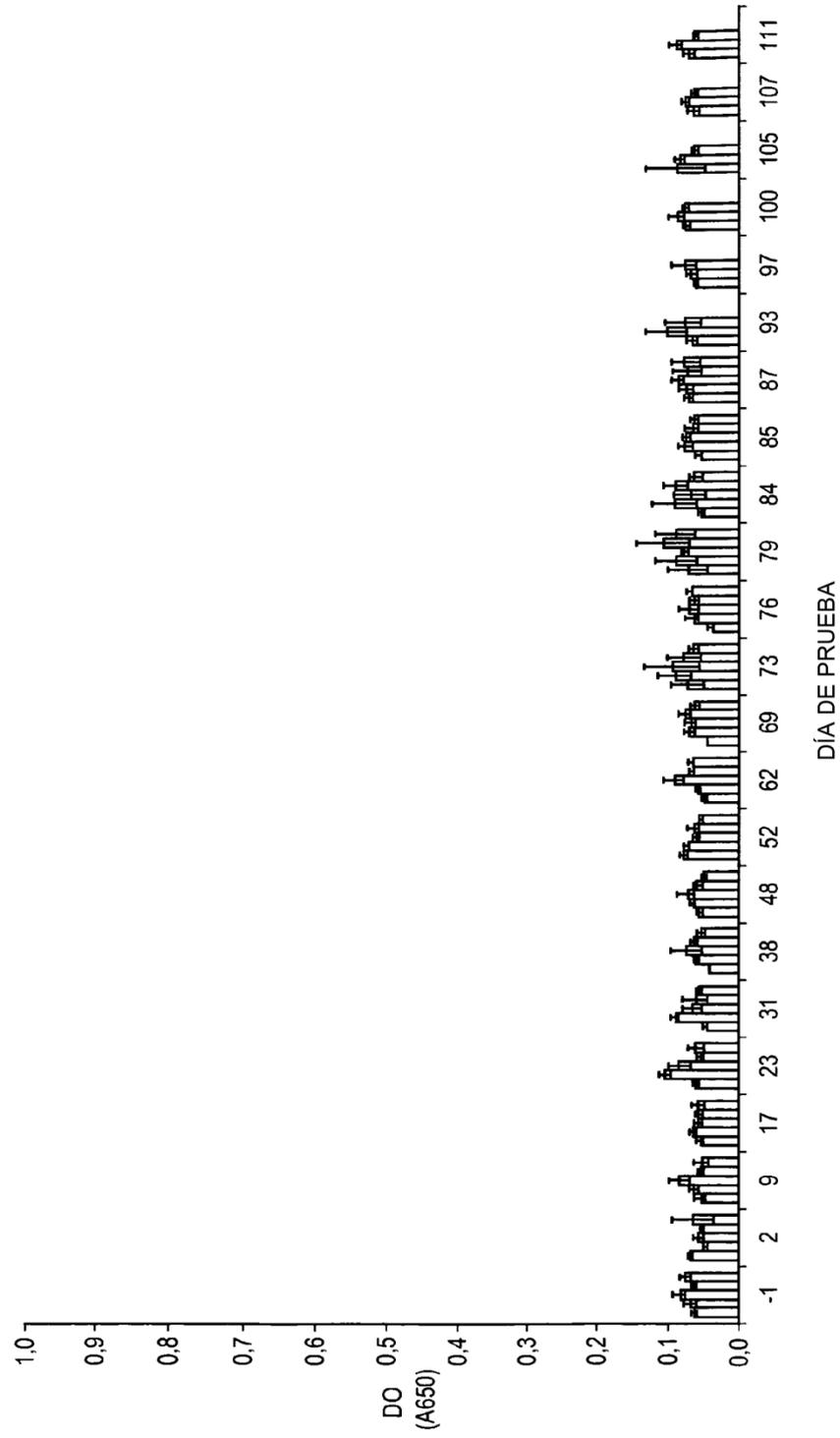


FIG. 6

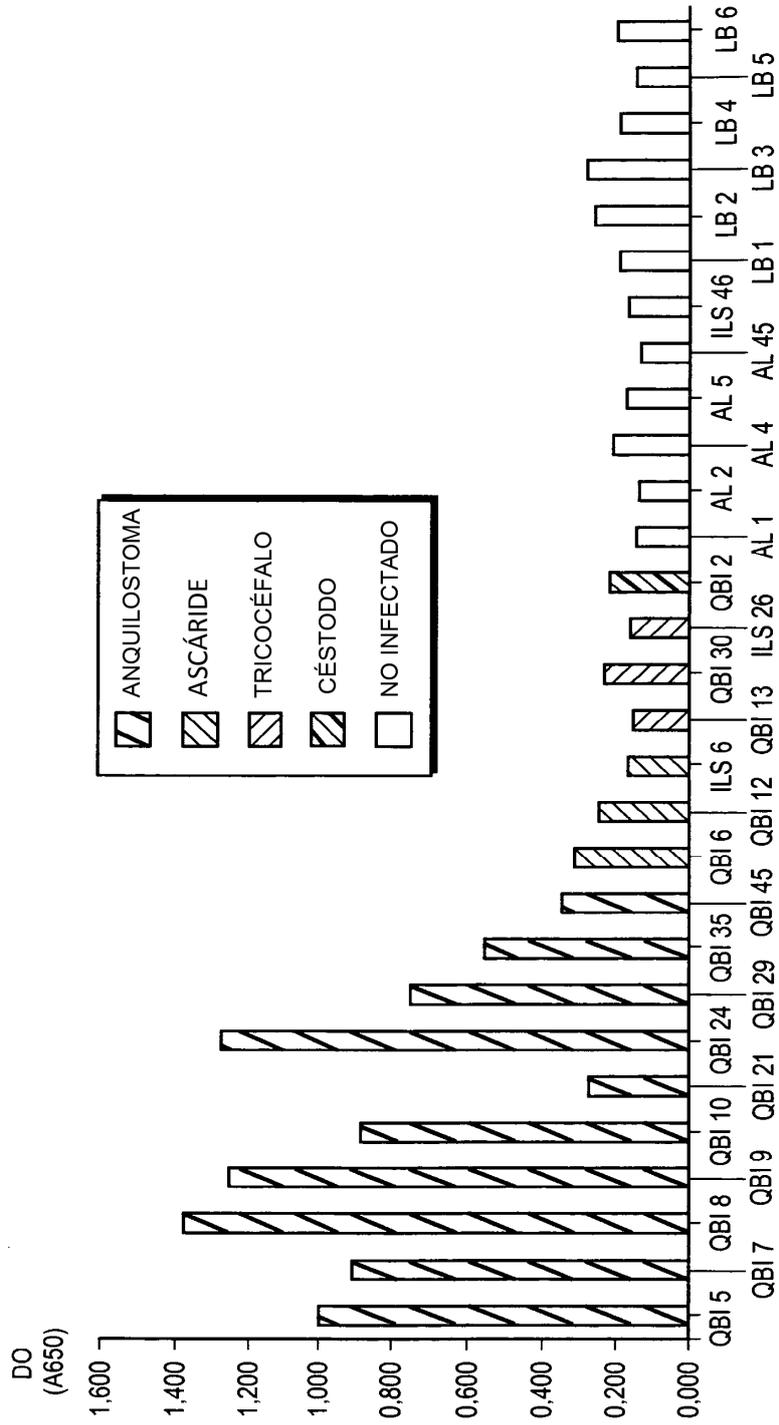


FIG. 7

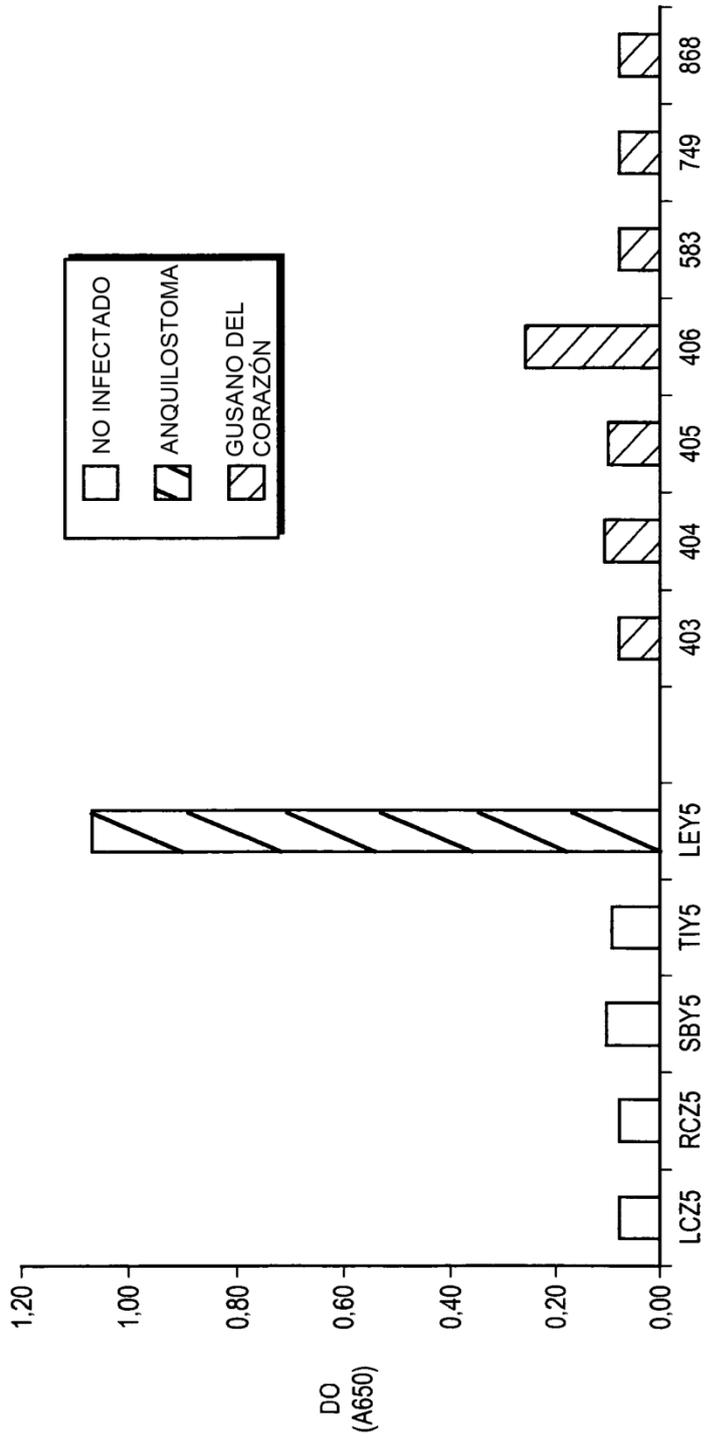


FIG. 8