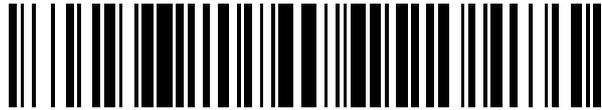


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 581 880**

51 Int. Cl.:

G01N 33/569 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2007 E 07843795 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.06.2016 EP 2067036**

54 Título: **Método para diferenciar animales infectados de animales vacunados usando polipéptidos de Ehrlichia canis**

30 Prioridad:

04.10.2006 US 542878

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

08.09.2016

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**O'CONNOR, THOMAS;
KRAH, REGIS, III y
BEALL, MELISSA**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 581 880 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

Método para diferenciar animales infectados de animales vacunados usando polipéptidos de *Ehrlichia canis*

La presente invención se refiere a métodos para distinguir entre un animal que se ha infectado con *Ehrlichia canis* de un animal que no se ha infectado con *E. canis*; métodos para distinguir entre un animal que se ha infectado con *E. canis* de un animal que no se ha infectado con *E. canis* independientemente de si el animal se ha vacunado con una vacuna anti-*E. canis*; métodos para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo o fragmento de este contra los polipéptidos de *E. canis* en una muestra de prueba; y las composiciones que comprenden los polipéptidos de *E. canis*.

La *Ehrlichia* son patógenos intracelulares obligados que infectan los leucocitos circulantes en huéspedes mamíferos. *Ehrlichia canis* puede infectar a y caninos y seres humanos y causar la ehrlichiosis monocítica canina (CME) y la ehrlichiosis monocítica humana (EMH), respectivamente. La enfermedad canina se caracteriza por fiebre, linfadenopatía, pérdida de peso y pancitopenia. En los seres humanos la enfermedad se caracteriza por fiebre, cefalea, mialgia, y leucopenia. La detección y el tratamiento tempranos son importantes para tratar tanto la ehrlichiosis canina como la humana. En este contexto, el documento WO 00/12688 A1 describe un gen de proteína 120 kDa de *E. canis*, la proteína respectiva, y sus usos.

En una forma de realización, la invención proporciona un método para distinguir entre un animal que se ha infectado con *E. canis* de un animal que no se ha infectado con *E. canis*, el método comprende:

- (a) poner en contacto una muestra biológica de un animal con uno o más polipéptidos purificados que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o sus combinaciones; y
- (b) detectar si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente al uno o más polipéptidos purificados;

donde, si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente al uno o más polipéptidos purificados, entonces el animal se ha infectado con *E. canis*.

Otra forma de realización de la invención proporciona un método para distinguir entre animales que se han infectado con *E. canis* y animales que no se han infectado con *E. canis* independientemente de si el animal se ha vacunado con una vacuna anti-*E. canis*. El método comprende poner en contacto una muestra biológica de un animal con uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados que no se unen específicamente a anticuerpos que son un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna anti-*E. canis*, donde el uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o sus combinaciones, y detectar si un anticuerpo de la muestra se une específicamente al uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados, donde si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente al uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados, entonces el animal se ha infectado con *E. canis*.

Aun otra forma de realización de la invención proporciona un método para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo o fragmento de este, en una muestra de prueba, donde el anticuerpo o fragmento de este se une específicamente a uno o más polipéptidos purificados que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o sus combinaciones. El método comprende poner en contacto la muestra con uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o sus combinaciones en condiciones adecuadas para la unión específica del uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados al anticuerpo o fragmento de este, y detectar la presencia o ausencia de unión específica. La presencia de unión específica indica la presencia del anticuerpo o fragmento de este. La ausencia de unión específica indica la ausencia del anticuerpo o fragmento de este. El método también puede comprender detectar la cantidad de unión específica. La muestra de prueba puede ser suero, sangre, o saliva. El polipéptido purificado se puede inmovilizar en un soporte sólido. El polipéptido purificado puede estar marcado. La detección puede ser radioinmunoensayo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas, inmunohistoquímica, o en inmunoenzimático.

Otra forma de realización de la invención proporciona una composición que comprende uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o sus combinaciones.

El polipéptido purificado puede estar en una forma multimérica. El polipéptido purificado se puede ligar a una proteína heteróloga (una secuencia de aminoácidos no asociada normalmente con el polipéptido purificado en la naturaleza) un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un ligador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia-detención, un dominio de transmembrana, una ligando de purificación de proteína, o una combinación de estos.

En consecuencia, la invención proporciona antígenos de *Ehrlichia canis* que se pueden usar para diferenciar animales infectados naturalmente con *E. canis* de animales que han sido estimulados con *E. canis*, por ejemplo,

vacunados contra *E. canis*. La invención también proporciona composiciones y métodos para determinar la presencia de antígenos de *E. canis* y anticuerpos.

5 La Figura 1 muestra la evaluación del ensayo SNAP® 3Dx® de beagles de laboratorio. El dispositivo SNAP® se usa como es descrito por el fabricante. La muestra "Pre" es del día 0. La muestra "Pos" es del día 42. La mancha *E. canis* positiva fue positiva en los 4 perros para la muestra del día 42. Se observaron resultados similares para la muestra del día 70.

La Figura 2 muestra un gel de proteínas de *E. canis* separadas usando electroforesis en gel 2D. Se tiñó con azul Coomassie BIOSAFE™ (Bio-Rad Inc.).

10 La Figura 3 muestra una transferencia Western de proteínas de *E. canis* usando sueros de perro recolectados en el día 0. La dilución del plasma es 1:100. Esos perros fueron negativos para la reactividad con los antígenos de *E. canis*.

La Figura 4 muestra una transferencia Western de proteínas de *E. canis* usando sueros de perro de una mezcla de cuatro animales estimulados. La dilución del suero es 1:100.

15 La Figura 5 muestra una transferencia Western de proteínas de *E. canis* usando sueros de perro de una mezcla de animales infectados. La dilución del suero es 1:1000.

20 La Figura 6 muestra una transferencia Western de seis antígenos DIVA diferentes de *E. canis* expresados en *E. coli* y analizados con sueros de perro de una mezcla de cuatro animales infectados (A) o sueros de perro mezclados de cuatro animales estimulados (B). Las diluciones de suero fueron 1:100 para animales estimulados o 1:500 para los animales infectados. Los antígenos DIVA representados incluyen: (1) antígeno 200 kDa, (2) Proteína ribosómica L1, (3a y 3b) "ATPasa"- dos segmentos diferentes, (4) antígeno 120 kDa, (5) Proteínas de shock térmico/antígeno p16.

La Figura 7 demuestra que el antígeno p16 clonado es reconocido por los sueros de perros infectados con *E. canis* pero no por los estimulados con el organismo cultivado. Los lisados de bacterias no inducidas (U) o inducidas (I) transformadas con un vector que expresa el antígeno p16 o el fragmento genómico original (+C) se separaron por SDS-PAGE y se transfirieron a nitrocelulosa para el análisis de transferencia Western.

25 Se describen los antígenos de *Ehrlichia canis* que se pueden usar para diferenciar animales infectados naturalmente con *E. canis* de animales que han sido estimulados con *E. canis*, por ejemplo, vacunados contra *E. canis*.

Antes de describir la presente invención en detalle, se definirán numerosos términos.

Como se usa en la presente, las formas singulares "un", "una" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

30 Como se usa en la presente, el término "polipéptido" se refiere a un compuesto de una cadena única o un complejo de dos o más cadenas de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Las cadenas pueden ser de cualquier longitud y pueden comprender una proteína de fusión. Aunque la "proteína" se usa a menudo en referencia a polipéptidos relativamente grandes, y "péptido" se utiliza a menudo en referencia a polipéptidos pequeños, el uso de estos términos en la técnica se superpone y varía. El término "polipéptido" como se usa en la presente se refiere de modo intercambiable a péptidos, polipéptidos, proteínas, o proteínas de fusión a menos que se indique lo contrario. El término "aminoácido" se refiere a una unidad monomérica de un péptido, polipéptido o proteína.

35 Como se usa en la presente, "antígeno" se refiere a una molécula contra la que un sujeto puede iniciar una respuesta humoral y/o inmune celular. Los antígenos pueden ser de cualquier tipo de molécula biológica, que incluyen, por ejemplo, metabolitos intermediarios simples, azúcares, lípidos, y hormonas, así como macromoléculas tales como los carbohidratos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. En las composiciones y métodos de la invención, se prefiere que el antígeno sea un polipéptido, por ejemplo, uno que comprende al menos aproximadamente seis o más aminoácidos.

40 Como se usa en la presente, un "derivado" de un polipéptido del antígeno de *E. canis*, o un antígeno o polipéptido que se "deriva de" antígeno o polipéptido de una *E. canis*, se refiere a un antígeno o polipéptido en el que la forma nativa se ha purificado, modificado o alterado. Tales modificaciones incluyen, pero sin limitación: sustituciones, modificaciones, adiciones o supresiones de aminoácidos; alteraciones en el patrón de lipidación, glicosilación o fosforilación; reacciones de grupos laterales amino, carboxilo o hidroxilo libres de los residuos de aminoácidos presentes en el polipéptido con otras moléculas orgánicas y no orgánicas; y otras modificaciones, cualquiera de las cuales pueden producir cambios en la estructura primaria, secundaria o terciaria.

45 Una "muestra biológica" es cualquier muestra de un animal que se espera que contenga inmunoglobulinas. En general, estas muestras son sangre entera y componentes de sangre, pero en algunas circunstancias pueden incluir saliva, orina, lágrimas, otros fluidos corporales, extractos de tejidos o extractos celulares.

Una "infección", tal como en la infección con un *E. canis*, significa que el animal ha estado expuesto a *E. canis*, independientemente de si el animal presenta síntomas clínicos de *E. canis*. Una infección natural se refiere a una

exposición que se produce como resultado de uno de los métodos de transmisión naturales para *E. canis*, tal como la transmisión por garrapatas. Una infección no incluye una exposición a *E. canis* a través de la vacunación.

Un "polipéptido o antígeno que no es un elemento de la vacuna anti-*E. canis*" es cualquier polipéptido o antígeno de *E. canis* que no está presente o no es una porción inmunológicamente activa de la vacuna o una vacuna anti- *E. canis* particular. Los elementos de la vacuna pueden ser porciones de una vacuna de subunidad que incluye menos que la bacteria entera; estas porciones se pueden sintetizar químicamente o expresar de forma recombinante antes de convertirse en parte de la vacuna, y estas porciones pueden ser codificadas por uno o más vectores que expresan una composición inmunogénica in vivo.

Un "anticuerpo que es un componente de la respuesta inmune de un animal a la vacuna anti-*E. canis*" se refiere a un anticuerpo que es inducido como resultado de una vacunación con una vacuna anti-*E. canis*. Estos anticuerpos pueden ser idénticos o similares a los anticuerpos producidos como resultado de una infección de *E. canis* natural. Estos anticuerpos se mantendrán a un título suficiente y con el fin de proporcionar un efecto protector y neutralizante contra las bacterias. Una vacunación exitosa produce un nivel medible del anticuerpo (o anticuerpos) que está inducido por un componente de la vacuna anti-*E. canis*. Los ejemplos de antígenos de *E. canis* que producen anticuerpos que pueden ser un componente de la respuesta inmune de un animal a una vacuna anti-*E. canis* son p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8, p28-9 (ver, la Patente U.S. Nros. 6.660.269;.. 6.458,942; 6.403,780; 6.392.023) proA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa (ver, la Publicación de Patente U.S. 20040170972 Publ), P43 (ver, la patente US. N° 6.355,777), que es la porción N-terminal de p153, una glicoproteína (ver, Publicación de patente US 2004/0121433), y p153.

Una respuesta inmunitaria es el desarrollo en un organismo de una respuesta inmunitaria mediada por células y/o anticuerpo a un antígeno tal como un polipéptido. Usualmente, tal respuesta incluye pero sin limitación uno o más de los siguientes: producción de anticuerpos, células B, células T auxiliares, células T supresoras, y/o células T citotóxicas. Una respuesta inmunitaria se puede detectar usando cualquiera de varios ensayos conocidos para los expertos en la técnica.

Polipéptidos de la invención

Las muestras biológicas de animales que han sido vacunados contra *E. canis* tienen el potencial para la producción de un resultado positivo en una prueba para la infección con *E. canis* debido a la presencia de anticuerpos producidos en respuesta a la vacuna. En un aspecto, la invención proporciona un método para distinguir entre los animales que se han infectado con *E. canis*, y los animales que no se han infectado con *E. canis*. Los métodos incluyen poner en contacto una muestra biológica del animal con un antígeno derivado de *E. canis* que no se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta de anticuerpos del animal a una vacuna anti-*E. canis* particular.

El desarrollo de anticuerpos anti-*E. canis* en un animal contra una vacuna depende de la vacuna particular utilizada para vacunar al animal. La diferencia en la respuesta inmune entre los animales que se vacunan contra *E. canis* y animales que se infectan natural o experimentalmente con *E. canis* proporciona un medio para determinar si un animal se ha vacunado o está infectado de forma natural o experimentalmente. Por lo tanto, usando los métodos de la invención, los animales que se han infectado con *E. canis* se pueden distinguir de los animales que no se han infectados con *E. canis* o se han vacunado contra *E. canis*. Los antígenos de la invención, sus regiones inmunodominantes y epítopos se pueden utilizar en los métodos de la invención. Estas composiciones se pueden denominar como antígenos DIVA de *E. canis* (Diferencia animales infectados de vacunados). Un antígeno DIVA de *E. canis* induce una respuesta inmune, por ejemplo, la producción de anticuerpos específicos, en un animal que es diferente de la respuesta inmune inducida en el animal por la vacuna anti-*E. canis* particular.

En consecuencia, la detección de la unión entre un antígeno DIVA de *E. canis* y un anticuerpo que no es un componente de la respuesta inmune de un animal a una vacuna particular puede indicar una infección natural. La ausencia de tal unión puede indicar la vacunación o no la infección. Además, un segundo antígeno separado, tal como antígeno un *E. canis* que se une específicamente un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmune de los animales a una vacuna anti-*E. canis* particular, se puede utilizar para detectar los anticuerpos producidos en respuesta a la vacunación. La detección de ningún anticuerpo indica que no hay infección ni vacunación. Como tal, varias combinaciones de reactivos de captura separados pueden llevar a la determinación del estado de vacunación y/o infección del sujeto de prueba.

En un aspecto, un método de la invención incluye poner en contacto una muestra biológica de un animal con un antígeno que es una parte de las bacterias nativas de *E. canis*, pero no es un elemento de una vacuna anti-*E. canis* particular. Un animal es cualquier mamífero que pueda ser vacunado contra *E. canis* y, en particular, los caninos. Además, los seres humanos se pueden vacunar contra *E. canis*. En la presente se describe un método para determinar si un animal no se ha infectado con *E. canis* y no se ha vacunado contra *E. canis*. Una muestra biológica de un animal se analiza para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para el antígeno DIVA de *E. canis*, y la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para una vacuna anti-*E. canis* particular. Luego se determina que el animal no se ha infectado y no se ha vacunado mediante la determinación de la ausencia de tales anticuerpos.

En un aspecto de la invención, un antígeno DIVA no es un elemento de una vacuna anti-*E. canis*. El estado de vacunación o infección de un animal se puede determinar mediante la detección de si los anticuerpos de la muestra se unen a uno o más antígenos usados en la vacuna. Si los anticuerpos de la muestra se unen a uno o más de los antígenos, el animal está vacunado o infectado, Si ningún anticuerpo se une al polipéptido de DIVA, entonces se puede determinar que el animal se ha vacunado. Si no se detecta unión para el antígeno, entonces se puede determinar que el animal no está infectado ni vacunado.

Un polipéptido de la invención se puede modificar en forma postraducciona. Un polipéptido purificado es una preparación de polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, otros tipos de polipéptidos, precursores químicos, productos químicos usados en la síntesis del polipéptido, o sus combinaciones. Una preparación de polipéptidos que está sustancialmente libre de material celular, medio de cultivo, precursores químicos, productos químicos usados en la síntesis del polipéptido tiene menos de aproximadamente 30%, 20%, 10%, 5%, 1% o más de otros polipéptidos, medio de cultivo, precursores químicos, y/u otros productos químicos usados en la síntesis. En consecuencia, un polipéptido purificado es aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más puro.

Los polipéptidos purificados de la invención pueden ser polipéptidos de longitud completa o fragmentos de polipéptidos. Por ejemplo, los fragmentos de polipéptidos de la invención pueden comprender aproximadamente 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750 aminoácidos contiguos o más de polipéptidos de la invención. Los ejemplos de polipéptidos de la invención incluyen los mostrados en las SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21 ó 22. Las variantes de polipéptidos son al menos aproximadamente 80, o aproximadamente 90, 96, 98 ó 99% idénticos a las secuencias de polipéptidos mostradas en las SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21 ó 22 y también son polipéptidos de la invención. Las variantes de polipéptidos tienen una o más variaciones conservadoras de aminoácidos u otras modificaciones de menor importancia y retienen la actividad biológica, es decir, son equivalentes biológicamente funcionales. Un equivalente biológicamente activo tiene una función sustancialmente equivalente en comparación con el polipéptido de tipo salvaje correspondiente.

Porcentaje de identidad de secuencia tiene un significado reconocido en la técnica y existen numerosos métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o polinucleótidos. Ver por ejemplo, Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, New York, (1988); Smith, Ed., Biocomputing: Informatics And Genome Projects, Academic Press, New York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis Of Sequence Data, Part I, Humana Press, New Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); y Gribskov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, New York, (1991). Los métodos para el alineamiento de polinucleótidos o polipéptidos están codificados en programas informáticos, que incluyen el paquete de programas GCG (Devereux et al., Nuc. Acids Res. 12:387 (1984)), BLASTP, BLASTN, FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. 215:403 (1990)), y el programa Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) que usa el algoritmo de homología local de Smith and Waterman (Adv. App. Math., 2:482-489 (1981)). Por ejemplo, se puede usar el programa de computadora ALIGN que emplea el algoritmo FASTA con una búsqueda de brecha afín con una penalización de apertura de brecha de -12 y una penalización de extensión de brecha de -2.

Cuando se utiliza cualquiera de los programas de alineamiento de secuencias para determinar si una secuencia particular es, por ejemplo, aproximadamente 95% idéntica a una secuencia de referencia, los parámetros se ajustan de tal manera que el porcentaje de identidad se calcula respecto de la longitud completa del polinucleótido de referencia y que se permiten brechas en la identidad de hasta el 5% del número total de nucleótidos en el polinucleótido de referencia.

Las variantes generalmente se pueden identificar mediante la modificación de una de las secuencias de polipéptidos de la invención, y evaluación de las propiedades del polipéptido modificado para determinar si es un equivalente biológico. Una variante es un equivalente biológico si reacciona sustancialmente igual que un polipéptido de la invención en un ensayo tal como un ensayo inmunohistoquímico, un ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), ensayo inmunoenzimático o un ensayo de transferencia western, por ejemplo tiene 90-110% de la actividad del polipéptido original. En una forma de realización, el ensayo es un ensayo de competición donde el polipéptido biológicamente equivalente es capaz de reducir la unión del polipéptido de la invención a un correspondiente antígeno reactivo o anticuerpo en aproximadamente 80, 95, 99, o 100%. Un anticuerpo que une específicamente un correspondiente polipéptido tipo salvaje también se une específicamente a la variante de polipéptido. Las variantes de polipéptidos de la invención pueden comprender aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, o 6 sustituciones conservadoras de aminoácidos.

Una sustitución conservadora es una en la que un aminoácido se sustituye con otro aminoácido que tiene propiedades similares, de manera que un experto en la técnica de la química de péptidos puede esperar que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido permanezcan sustancialmente sin cambios. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservadores: (1) ala, pro, Gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) Lys, Arg, His; y (5) Phe, tyr, trp, his.

Un polipéptido de la invención también puede comprender una secuencia señal (o líder) que dirige en forma co-traducciona o postraducciona la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede comprender un ligador u

otra secuencia para facilitar la síntesis, purificación o identificación del polipéptido (por ejemplo, poli-His), o mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido puede conjugarse con una región Fc de la inmunoglobulina o albúmina sérica bovina.

5 Un polipéptido se puede ligar de modo covalente o no covalente a una secuencia de aminoácidos al cual el polipéptido no está asociado normalmente en la naturaleza. Adicionalmente, un polipéptido se puede ligar de modo covalente o no covalente a compuestos o moléculas diferentes de los aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido se puede ligar a un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un ligador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia-detención, un dominio de transmembrana, un ligando de purificación de proteína, o una combinación de estos. En una forma de realización de la invención, un ligando de purificación de proteína puede ser uno o más residuos de aminoácido C, por ejemplo, en el extremo amino terminal o extremo carboxi terminal de un polipéptido de la invención. Un espaciador de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que no están usualmente asociados con un polipéptido de la invención en la naturaleza. Un espaciador de aminoácidos puede comprender aproximadamente 1, 5, 10, 20, 100 ó 1.000 aminoácidos.

15 Si se desea, un polipéptido puede ser una proteína de fusión, que también puede contener otras secuencias de aminoácidos, tales como ligadores de aminoácidos, espaciadores de aminoácidos, secuencias señal, secuencias de transferencia-detención TMR, dominios de transmembrana, así como ligandos útiles en la purificación de proteína, tal como glutation-S-transferasa, marca histidina, y proteína A estafilocócica o sus combinaciones. Más de un polipéptido de la invención puede estar presente en una proteína de fusión. Los fragmentos de polipéptidos de la invención pueden estar presentes en una proteína de fusión de la invención. Una proteína de fusión de la invención puede comprender uno o más polipéptidos mostrados en la SEQ ID NO: 18; 19, 20, 21 ó 22, fragmentos de estos, o sus combinaciones.

Los polipéptidos de la invención pueden estar en una forma multimérica. Es decir, un polipéptido puede comprender una o más copias de las SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21, 22 o una combinación de estos. Un polipéptido multimérico puede ser un péptido de antígeno múltiple (MAP). Ver por ejemplo, Tam, J. Immunol. Methods, 196:17-32 (1996).

25 Los polipéptidos de la invención pueden comprender un antígeno que es reconocido por un anticuerpo reactivo contra *E. canis*. El antígeno puede comprender uno o más epítomos (es decir, determinantes antígenicos). Un epítomo puede ser un epítomo lineal, epítomo secuencial o un epítomo conformacional. Los epítomos dentro de un polipéptido de la invención se pueden identificar por varios métodos. Ver, por ejemplo, Patente U.S. N.º 4.554.101; Jameson & Wolf, *CABIOS* 4:181-186 (1988). Por ejemplo, un polipéptido de la invención se puede aislar y analizar. Una serie de péptidos cortos, que juntos abarcan una secuencia de polipéptido entero, se puede preparar por escisión proteolítica. Comenzando con, por ejemplo, fragmentos de polipéptido 100-mer, cada fragmento se puede analizar por la presencia de epítomos reconocidos en un ELISA. Por ejemplo, en un ensayo ELISA un polipéptido de *E. canis*, tal como un fragmento de polipéptido 100-mer, está unido a un soporte sólido, tal como los pocillos de una placa de múltiples pocillos de plástico. Una población de anticuerpos se marca, se añade al soporte sólido y se deja unir al antígeno no marcado, en condiciones en que se bloquea la absorción no específica, y cualquier anticuerpo no unido y otras proteínas se lavan. La unión del anticuerpo se detecta mediante, por ejemplo, una reacción que convierte un sustrato incoloro en un producto de reacción coloreado. Los fragmentos progresivamente más pequeños y superpuestos luego se pueden analizar a partir de un 100-mer identificado para mapear el epítomo de interés.

40 En una forma de realización de la invención, un antígeno DIVA comprende un epítomo o región inmunodominante. Es decir, un epítomo o región que induce más frecuentemente y une a los anticuerpos en una población de este cuando se compara con otros epítomos. Un antígeno puede tener uno o más epítomos inmunodominantes. Los epítomos inmunodominantes se pueden mapear sobre, por ejemplo, un polipéptido después de que se ha administrado el polipéptido a un animal o antes de tal administración. Ver por ejemplo, U.S. Pat. Publ. 45 2004/0209324.

Un polipéptido de la invención se puede producir de forma recombinante. Un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención se puede introducir en un vector de expresión recombinante, que se puede expresar en un sistema de células huésped de expresión adecuado usando técnicas bien conocidas en la materia. Una variedad de sistemas de expresión de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos e insectos están disponibles en la técnica y se puede usar tal sistema de expresión. Opcionalmente, un polinucleótido que codifica un polipéptido se puede traducir en un sistema de traducción libre de células. Un polipéptido también se puede sintetizar químicamente u obtener a partir de células de *E. canis*.

Un polipéptido inmunogénico de la invención puede comprender una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21 ó 22. Un polipéptido inmunogénico puede inducir anticuerpos u otras respuestas inmunitarias (por ejemplo, respuestas de células T del sistema inmunitario) que reconoce los epítomos de polipéptidos que tienen las SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21 ó 22. Un polipéptido inmunogénico de la invención también puede ser un fragmento de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21 ó 22. Un fragmento del polipéptido inmunogénico de la invención puede ser de aproximadamente 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750 aminoácidos de longitud.

Los anticuerpos específicos para *E. canis* se pueden detectar en los fluidos o tejidos biológicos por cualquier método conocido en la técnica. Los métodos más simples son generalmente métodos de inmunoensayo. Uno de tales métodos es un método basado en la competición en el que las muestras de suero se preincuban con el antígeno de *E. canis* que no es un elemento de la vacuna contra un *E. canis* (por ejemplo, antígeno DIVA de *E. canis*), y después se añaden a una fase sólida, tal placa de microtitulación, que tiene un anticuerpo monoclonal inmovilizado específico para el antígeno DIVA de *E. canis*. Los anticuerpos específicos para el antígeno DIVA de *E. canis* en la muestra evitarán la unión del antígeno DIVA de *E. canis* al anticuerpo inmovilizado. La detección de cualquier unión del antígeno DIVA de *E. canis* al anticuerpo inmovilizado se puede determinar mediante la adición de un segundo compañero de unión para el antígeno de *E. canis*, ya sea marcado directamente o capaz de marcarse a través de la unión a otro compañero de unión que tiene una marca. Una muestra positiva, es decir, una muestra que tiene anticuerpos específicos para el antígeno DIVA de *E. canis*, se asocia con una disminución de la señal de la marca.

En una forma de realización particular, los anticuerpos para un antígeno DIVA de *E. canis* en una muestra biológica se puede detectar mediante el contacto de la muestra con un antígeno DIVA de *E. canis* y la adición de la muestra a una placa de microtitulación recubierta con un anticuerpo monoclonal anti-antígeno DIVA. La unión del antígeno DIVA a la placa de microtitulación se puede detectar mediante la adición de un anticuerpo policlonal de conejo contra el antígeno DIVA y la adición de un anticuerpo policlonal anti-conejo de burro conjugado con HRP. Los anticuerpos de la muestra evitarán la unión del antígeno DIVA al anticuerpo inmovilizado, de este modo causa una disminución en la señal.

Otro método para la detección de anticuerpos específicos para el antígeno DIVA de *E. canis* es un ensayo sándwich donde una muestra biológica que se sospecha que contiene un anticuerpo específico para el antígeno DIVA de *E. canis* se pone en contacto con el antígeno DIVA de *E. canis* inmovilizado para formar un complejo inmunológico. La presencia de un anticuerpo específico para el antígeno DIVA de *E. canis* se determina por la detección de la unión de un compañero de unión marcado para el anticuerpo de *E. canis*, tal como un segundo anticuerpo.

En un aspecto de la invención, los antígenos DIVA de *E. canis* se pueden inmovilizar en un soporte sólido adecuado. Una muestra biológica se pone en contacto con el antígeno DIVA de *E. canis*, al cual se unen los anticuerpos anti-*E. canis*, si dichos anticuerpos están presentes en la muestra. La unión se puede detectar por cualquier medio adecuado, por ejemplo, enzimas, radionúclidos, particulados o marcadores fluorescentes. En una forma de realización adecuada, el reactivo de detección se puede asociar con una proteína que es la misma o similar a la que se utiliza para capturar los anticuerpos anti-*E. canis* (si está presente). En una forma de realización particular, los anticuerpos anti-*E. canis* se pueden detectar mediante la inmovilización de un antígeno de *E. canis* en un soporte sólido. Las muestras biológicas se pueden poner en contacto con el soporte sólido y, después de la extracción de la muestra no unida, la unión de los anticuerpos de *E. canis* al antígeno se puede lograr con, por ejemplo, un anticuerpo IgG marcado.

Los antígenos DIVA de la invención también pueden comprender mimitopos de antígenos DIVA de la invención. Un mimitopo es un epítipo del péptido aleatorio que imita a un epítipo antigénico natural durante la presentación de epítipos. Los epítipos de péptidos aleatorios se pueden identificar mediante la generación o la selección de una biblioteca de epítipos de péptidos aleatorios. La biblioteca se pone en contacto con un anticuerpo. Se identifican mimitopos que son específicamente inmunorreactivos con el anticuerpo. Las bibliotecas de péptidos aleatorios, por ejemplo, se pueden desplegar en un fago o generar como bibliotecas combinatorias.

Los antígenos DIVA de *E. canis*, por ejemplo, polipéptidos, los polipéptidos, pueden ser naturales, es decir, se aíslan de una fuente natural, o pueden ser sintéticos (es decir, se sintetizan químicamente o producen de manera recombinante usando técnicas de ingeniería genética). Las proteínas naturales se pueden aislar de bacterias enteras por técnicas convencionales, tales como cromatografía de afinidad. Los anticuerpos policlonales o monoclonales se pueden utilizar para preparar una columna de afinidad adecuada por técnicas bien conocidas.

Las proteínas que son inmunológicamente de reacción cruzada con una proteína de *E. canis* natural se pueden sintetizar químicamente. Por ejemplo, los polipéptidos que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, más habitualmente menos de aproximadamente 80 aminoácidos, y típicamente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, se pueden sintetizar por el método de síntesis en fase sólida de Merrifield bien conocido, donde se añaden secuencialmente aminoácidos a una cadena en crecimiento. Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc, 85: 2149-2156. También se pueden utilizar las proteínas recombinantes. Estas proteínas se pueden producir mediante la expresión en células cultivadas de moléculas de ADN recombinante que codifican una porción deseada del genoma de *E. canis*. La porción del genoma de *E. canis* puede por sí mismo ser natural o sintético, con genes naturales obtenibles a partir de la bacteria aislada por técnicas convencionales.

Polinucleótidos de *E. canis*

Los polinucleótidos que se pueden usar en relación con la invención contienen menos que un genoma microbiano entero y puede ser ácidos nucleicos de cadena simple o doble. Un polinucleótido puede ser ARN, ADN, ADNc, ADN genómico, ARN o ADN sintetizado químicamente o sus combinaciones. Los polinucleótidos se pueden purificar libres de otros componentes, tales como proteínas, lípidos y otros polinucleótidos. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser 50%, 75%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% purificado. Los polinucleótidos codifican los polipéptidos

descriptos anteriormente. En una forma de realización los polinucleótidos codifican polipéptidos mostrados en las SEQ ID NOs: 18, 19, 20, 21, 22 o sus combinaciones. Los polinucleótidos incluyen los mostrados en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, o sus combinaciones. Los polinucleótidos pueden comprender secuencias de nucleótidos, tales como secuencias que codifican ligadores, secuencias señal, secuencias de transferencia-detención TMR, dominios de transmembrana, o ligandos útiles en la purificación de proteína tal como glutatión-S-transferasa, marca de histidina y proteína estafilocócica A.

Los polinucleótidos se pueden aislar. Un polinucleótido aislado es un polinucleótido que no es inmediatamente contiguo a una o ambas secuencias genómicas flanqueantes 5' y 3' a las que está naturalmente asociado. Un polinucleótido aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN recombinante de cualquier longitud, siempre que se eliminen o estén ausentes las secuencias de ácidos nucleicos naturales que se hallan inmediatamente flanqueantes de la molécula de ADN recombinante en un genoma natural. Los polinucleótidos aislados incluyen también moléculas de ácido nucleico no naturales. Una molécula de ácido nucleico que existe entre cientos a millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o genómicas, o porciones de gel que contienen un digesto de restricción de ADN genómico no se consideran un polinucleótido aislado. La secuencia de nucleótidos completa para *E. canis* está disponible en, por ejemplo, GenBank como número de acceso NCBI: NZ AAEJO 1000001.

Los polinucleótidos también pueden comprender fragmentos que codifican polipéptidos inmunogénicos. Los polinucleótidos pueden codificar polipéptidos de longitud completa, fragmentos de polipéptidos, y variantes de polipéptidos o de fusión.

Las secuencias degeneradas de nucleótidos que codifican polipéptidos, así como las secuencias de nucleótidos homólogas que son al menos aproximadamente 80, o aproximadamente 90, 96, 98, o 99% idénticas a las secuencias de polinucleótidos y los complementos de estos también se describen en la presente. El por ciento de identidad de secuencia se puede calcular como se describe en la sección "Polipéptidos". Las secuencias de nucleótidos degeneradas son polinucleótidos que codifican un polipéptido o fragmentos de estos, pero difieren en la secuencia de ácidos nucleicos de la secuencia de polinucleótidos de tipo salvaje, debido a la degeneración del código genético. Las moléculas de ADN complementario (ADNc), homólogos de especies, y variantes de polinucleótidos de *E. canis* que codifican polipéptidos biológicamente funcionales de *E. canis* también son polinucleótidos de *E. canis*. Los polinucleótidos se pueden aislar a partir de secuencias de ácidos nucleicos presentes en, por ejemplo, una muestra biológica, tal como sangre, suero, saliva, o tejido de un individuo infectado. Los polinucleótidos también se pueden sintetizar en el laboratorio, por ejemplo, usando un sintetizador automático. Un método de amplificación tal como PCR se puede usar para amplificar polinucleótidos de ADN genómico o ADNc que codifica los polipéptidos.

Los polinucleótidos pueden comprender secuencias codificadoras para los polipéptidos de origen natural o pueden codificar secuencias alteradas que no se producen en la naturaleza. Si se desea, los polinucleótidos se pueden clonar en un vector de expresión que comprende elementos de control de expresión, que incluyen por ejemplo, orígenes de replicación, promotores, potenciadores, o de otros elementos reguladores que dirigen la expresión de los polinucleótidos en las células huésped. Un vector de expresión puede ser, por ejemplo, un plásmido, tal como pBR322, pUC, o ColE1, o un vector de adenovirus, tal como un vector de adenovirus Tipo 2 o vector Tipo 5. Opcionalmente, se pueden utilizar otros vectores, que incluyen pero sin limitación, virus Sindbis, virus de simio 40, vectores de alfavirus, vectores de poxvirus, y el citomegalovirus y vectores retrovirales, tales como el virus de sarcoma murino, virus de tumor mamario de ratón, virus de la leucemia murina de Moloney, y virus del sarcoma Rous. También se pueden usar minicromosomas tales como MC y MC1, bacteriófagos, fagémidos, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales bacterianos, partículas de virus, partículas tipo virus, cósmidos (plásmidos en los que se han insertado sitios cos del fago lambda) y replicones (elementos genéticos que son capaces de replicación bajo su propio control en una célula).

Los métodos para preparar polinucleótidos unidos operativamente a una secuencia de control de la expresión y expresarlos en una célula huésped son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, la Patente U. S. N.º 4.366.246. Un polinucleótido se une operativamente cuando se coloca adyacente a o cerca de uno o más elementos de control de expresión, que dirigen la transcripción y/o traducción del polinucleótido.

Los polinucleótidos se pueden usar, por ejemplo, como sondas o cebadores, por ejemplo cebadores de PCR, para detectar la presencia de los polinucleótidos de *E. canis* en una muestra, tal como una muestra biológica. La capacidad de tales sondas y cebadores para hibridarse específicamente con las secuencias de polinucleótidos de *E. canis* les permitirá ser de utilidad en la detección de la presencia de secuencias complementarias en una muestra dada. Las sondas y cebadores de polinucleótidos se pueden hibridar con las secuencias complementarias en una muestra tal como una muestra biológica, que incluye saliva, esputo, sangre, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado de la herida, o tejido. Los polinucleótidos de la muestra, por ejemplo, se pueden someter a electroforesis en gel u otras técnicas de separación de tamaño o se puede inmovilizar sin separación por tamaño. Las sondas de polinucleótidos o cebadores se pueden marcar. Los marcadores y métodos adecuados para marcar sondas y cebadores son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, marcas radiactivas incorporadas por traducción de mellas o por la quinasa, marcas de biotina, marcas fluorescentes, marcas quimioluminiscentes, marcas bioluminiscentes, marcas de quelante de metales y marcas enzimáticas. Los polinucleótidos de la muestra

se ponen en contacto con las sondas o cebadores en condiciones de hibridación de rigurosidad adecuadas.

De acuerdo con la aplicación, se pueden usar condiciones variadas de hibridación para obtener grados variables de selectividad de la sonda o cebador hacia la secuencia blanco.

5 Para aplicaciones que requieren alta selectividad, se pueden utilizar condiciones relativamente rigurosas, tales como condiciones de baja sal y/o alta temperatura, tal como la proporcionada por una concentración de sal de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M de sal a temperaturas de aproximadamente 50 °C a aproximadamente 70 °C. Para aplicaciones que requieren menor selectividad, se pueden usar condiciones de hibridación menos rigurosas. Por ejemplo, condiciones de sal de aproximadamente 0,14 M a aproximadamente 0,9 M de sal, a temperaturas que varían de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 55 °C. La presencia de un complejo hibridado que comprende la sonda o cebador y un polinucleótido complementario de la muestra de prueba indica la presencia de *E. canis* o secuencia de polinucleótidos de una *E. canis* en la muestra.

Anticuerpos

15 Los anticuerpos son moléculas de anticuerpo que se unen de forma específica y estable al polipéptido de *E. canis* de la invención o fragmento de este. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena simple (scFv), o un fragmento de un anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpos son una porción de un anticuerpo intacto que comprende el sitio de unión al antígeno o la región variable de un anticuerpo intacto, donde la porción está libre de los dominios constantes de cadena pesada de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y Fv.

20 Un anticuerpo puede ser cualquier clase de anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Un anticuerpo o fragmento de este se une a un epítipo de un polipéptido de la invención. Un anticuerpo se puede obtener in vivo en animales de laboratorio adecuados o in vitro usando técnicas de ADN recombinante. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Ver, 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 et al. Métodos Cell. Biol. 37: 7-56 (1993); Morrison, Ann. Rev. Immunol. 10: 239-65 (1992); Wright et al. Crit. Rev. Immunol. 12: 125-68 (1992). Por ejemplo, los anticuerpos policlonales se pueden producir mediante la administración de un polipéptido de la invención a un animal, tal como un humano u otro primate, ratón, rata, conejo, cobayo, cabra, cerdo, perro, vaca, oveja, burro o caballo. Se recolecta el suero del animal inmunizado y los anticuerpos se purifican a partir del plasma mediante, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, seguido por cromatografía, tal como cromatografía de afinidad. Las técnicas para producir y procesar anticuerpos policlonales son conocidas en la materia.

30 "Se une específicamente" o "específico para" se refiere a una reacción de unión que es determinante de la presencia de un antígeno en una población heterogénea de antígenos. Los anticuerpos se unen específicamente a un antígeno particular al menos dos veces más veces en el fondo y más típicamente más de 10 a 100 veces que el fondo. La unión específica se puede analizar usando, por ejemplo, un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), un radioinmunoensayo (RIA), o un ensayo de transferencia Western utilizando la metodología bien conocidos en la técnica.

40 Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítopos presentes en un antígeno, por ejemplo, un polipéptido de la invención, también se pueden producir fácilmente. Por ejemplo, las células B normales de un mamífero, tal como un ratón, que fue inmunizado con un polipéptido de la invención se pueden fusionar con, por ejemplo, con las células de mieloma de ratón sensibles a HAT para producir hibridomas. Los hibridomas que producen anticuerpos específicos anti- *E. canis* se pueden identificar usando RIA o ELISA y aislar por clonación en agar semi-sólido o por dilución limitante. Los clones que producen anticuerpos específicos anti-*E. canis* se aíslan mediante otra ronda de análisis. Los anticuerpos monoclonales se pueden analizar por especificidad usando técnicas estándar, por ejemplo, mediante la unión de un polipéptido de la invención a una placa de microtitulación y la medición de la unión del anticuerpo monoclonal mediante un ensayo ELISA. Las técnicas para producir y procesar anticuerpos monoclonales son conocidas en la materia. Ver, por ejemplo, Kohler y Milstein, Nature, 256: 495 (1975). Los isotipos particulares de un anticuerpo monoclonal se pueden preparar directamente, mediante la selección entre la fusión inicial, o se pueden preparar secundariamente, a partir de un hibridoma parental que secreta un anticuerpo monoclonal de un isotipo diferente mediante el uso de una técnica de selección de hermanos para aislar variantes de cambio de clase. Ver Stepleski et al., P.N.A.S. U.S.A. 82:8653 1985; Spria et al., J. Immunolog. Meth. 74:307, 1984. Los anticuerpos monoclonales también pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes. Ver, por ejemplo, Patente U.S. N.º 4.474,893; Patente U.S. N.º 4,816.567. Ver, por ejemplo, Patente U.S. N.º 4,676,980. Los anticuerpos también pueden ser construidos químicamente. Ver, por ejemplo, Patente U.S. N.º 4,676,980.

55 Los anticuerpos pueden ser quiméricos (ver, por ejemplo, la Patente U.S. N.º 5.482,856), humanizados (ver, por ejemplo, Jones et al, Nature 321: 522 (1986); Reichmann et al, Nature 332:323 (1988); Presta, Curr Op Struct Biol. 2: 593 (1992)), o anticuerpos humanos. Los anticuerpos humanos se pueden obtener mediante, por ejemplo, inmortalización directa, despliegue en fagos, ratones transgénicos, o una metodología Trimerica, ver, por ejemplo, Reisener et al., Trends Biotechnol. 16: 242-246 (1998).

Los anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de *E. canis* (por ejemplo, los polipéptidos de *E. canis* mostrados en las SEQ ID NO: 18, 19, 20, 21, 22), son particularmente útiles para detectar la presencia de *E. canis* o antígenos de *E. canis* en una muestra, tal como una muestra de suero, sangre, orina o saliva de un animal infectado con *E. canis* tal como tal un ser humano o un perro. Un inmunoensayo para *E. canis* o antígeno de *E. canis* puede utilizar un anticuerpo o varios anticuerpos. Un inmunoensayo para *E. canis* o antígeno de *E. canis* puede utilizar, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal dirigido hacia un epítipo de *E. canis*, una combinación de anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epítipos de un polipéptido de *E. canis*, anticuerpos monoclonales dirigidos hacia epítipos de diferentes polipéptidos de *E. canis*, anticuerpos policlonales dirigidos hacia el mismo antígeno de *E. canis*, anticuerpos policlonales dirigidos hacia diferentes antígenos de *E. canis*, o una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales. Los protocolos de inmunoensayo se pueden basar en, por ejemplo, en ensayos de competición, reacción directa, o tipo sándwich usando, por ejemplo, anticuerpo marcado. Los anticuerpos se pueden marcar con cualquier tipo de marca conocida en la técnica, que incluye, por ejemplo, marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, enzimáticas, de metal coloidal, radioisótopos y bioluminiscentes.

Los anticuerpos o fragmentos de estos se pueden unir a un soporte y se utilizan para detectar la presencia de *E. canis* o un antígeno de *E. canis*, por ejemplo, un antígeno DIVA de *E. canis* o antígeno no DIVA de *E. canis*. Los soportes incluyen, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nylon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliacrilamidas, agarosas y magnetita.

Los anticuerpos también se pueden usar para aislar organismos de *E. canis* o antígenos de *E. canis* por columnas de inmunoafinidad. Los anticuerpos se pueden fijar a un soporte sólido mediante, por ejemplo, adsorción o por enlace covalente de modo que los anticuerpos conserven su actividad inmunoselectiva. Opcionalmente, se pueden incluir grupos espaciadores para que el sitio de unión al antígeno del anticuerpo permanezca accesible. Los anticuerpos inmovilizados luego se pueden usar para unirse a organismos de *E. canis* o antígenos de *E. canis* de una muestra, tal como una muestra biológica que incluye saliva, suero, esputo, sangre, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado de la herida, o tejido. Los organismos de *E. canis* o antígenos de *E. canis* unidos se recuperan de la matriz de la columna mediante, por ejemplo, un cambio en el pH.

Los anticuerpos también se pueden utilizar en estudios de inmunolocalización para analizar la presencia y la distribución de un polipéptido de la invención durante diversos eventos celulares o condiciones fisiológicas. Los anticuerpos también se pueden utilizar para identificar moléculas que participan en la inmunización pasiva y para identificar moléculas que participan en la biosíntesis de los antígenos no proteicos. La identificación de tales moléculas puede ser útil en el desarrollo de vacunas. Los anticuerpos que incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos de cadena simple, se pueden usar para controlar el curso de mejora de una enfermedad causada por *E. canis*. Mediante la medición del aumento o disminución de los anticuerpos anti-*E. canis* para los antígenos de *E. canis* en una muestra de prueba en un animal, se puede determinar si un régimen terapéutico particular destinado a mejorar el trastorno es efectivo. Los anticuerpos se pueden detectar y/o cuantificar usando por ejemplo, ensayos de unión directa, tales como RIA, ELISA, o ensayos de transferencia Western.

Detección

Los métodos de la invención se pueden llevar a cabo usando, por ejemplo, técnicas de inmunoensayo bien conocidas por los expertos en la materia, que incluyen, pero sin limitación, el uso de microplacas y dispositivos de flujo lateral. En una forma de realización, uno o más antígenos DIVA de *E. canis* se inmovilizan sobre un soporte sólido en una localización distinta. La detección de los complejos antígeno-anticuerpo sobre el soporte sólido puede ser por cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la Patente U.S. N.º 5,726.010, describe un ejemplo de un dispositivo de flujo lateral útil en la presente invención. El dispositivo de la invención se puede usar para detectar uno o más anticuerpos a antígenos de *E. canis*.

La inmovilización de uno o más reactivos de captura de analitos, por ejemplo, polipéptidos de *E. canis*. En un dispositivo o soporte sólido se realiza de modo que un reactivo de captura de analitos no será lavado por la muestra, diluyente y/o procedimiento de lavado. Uno o más reactivos de captura de analito se pueden unir a una superficie mediante adsorción física (es decir, sin el uso de ligadores químicos) o por unión química (es decir, con el uso de ligadores químicos). La unión química puede generar una unión más fuerte de los reactivos de captura sobre una superficie y proporcionar una orientación y conformación definidas de las moléculas unidas a la superficie.

La invención se puede usar en relación con un dispositivo que es adecuado para un ensayo de flujo lateral. Por ejemplo, una muestra de prueba se añade a una matriz de flujo de una primera región (una zona de aplicación de la muestra). La muestra de prueba se transporta en una trayectoria de flujo de fluido por acción capilar a una segunda región de la matriz de flujo donde una marca es capaz de unirse y formar un primer complejo con un analito en la muestra de prueba. El primer complejo se lleva a una tercera región de la matriz de flujo donde un polipéptido de *E. canis* se inmoviliza en una ubicación distinta. Un segundo complejo se forma entre un polipéptido inmovilizado y el primer complejo que incluye el anticuerpo de la muestra. Por ejemplo, un primer complejo que comprende una partícula de sol de oro y un polipéptido de *E. canis* unido al anticuerpo anti-*E. canis* se unirán específicamente y formarán un segundo complejo con un segundo polipéptido de *E. canis* inmovilizado o con un segundo anticuerpo dirigido a los anticuerpos anti-*E. canis*. La marca que forma parte del segundo complejo se puede visualizar directamente.

En otro aspecto, la invención se puede utilizar en relación con uno o más reactivos de unión específica marcados que se pueden mezclar con una muestra de prueba antes de la aplicación a un dispositivo. En este caso, no es necesario tener reactivos de unión específicos marcados depositados y secados en un lecho de reactivo de unión específica en el dispositivo. Un reactivo de unión específica marcado, si se añade a una muestra de prueba o se depositado previamente en el dispositivo, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo marcado que se une específicamente un anticuerpo para *E. canis*.

Cualquiera o todas las formas de realización anteriores se puede proporcionar como un kit. En un ejemplo particular, tal kit puede incluir un dispositivo completo con reactivos de unión específica (por ejemplo, un reactivo de unión específica marcado no inmovilizado y un reactivo de captura de analito inmovilizado) y reactivo de lavado, así como de reactivo detector y reactivos de control positivo y negativo, si se desea o es apropiado. Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, buffer, y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden ser variadas, para proporcionar concentraciones en solución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del ensayo. En particular, los reactivos se pueden proporcionar como polvos secos, habitualmente liofilizados, que en disolución proporcionarán una solución de reactivo que tiene las concentraciones apropiadas para combinarse con una muestra.

Un antígeno DIVA de *E. canis*, por ejemplo, un polipéptido, puede ser un reactivo de captura de analitos inmovilizado en una zona de reacción (fase sólida). Un segundo reactivo de captura de analitos, por ejemplo, un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM, que se ha conjugado con una marca, se puede añadir a la muestra antes de añadir la muestra al dispositivo, o el segundo reactivo de captura del analito puede estar incorporado en el dispositivo. Por ejemplo, el reactivo de unión específica marcado se puede depositar y secar en una trayectoria de flujo de fluido que proporciona comunicación de fluido entre la zona de aplicación de la muestra y la fase sólida. El contacto del reactivo de unión específica marcado con la muestra de fluido produce la disolución del reactivo de unión específica marcado.

El dispositivo también puede incluir un reactivo líquido que transporta el material no unido (por ejemplo, muestra de fluido sin reaccionar y reactivos de unión específica no unidos) lejos de la zona de reacción (fase sólida). Un reactivo líquido puede ser un reactivo de lavado y solo sirve para eliminar el material no unido de la zona de reacción, o puede incluir un reactivo detector y servir tanto para eliminar el material no unido como para facilitar la detección del analito. Por ejemplo, en el caso de un reactivo de unión específica conjugado con una enzima, el reactivo detector incluye un sustrato que produce una señal detectable después de la reacción con el conjugado de enzima-anticuerpo en la zona reactiva. En el caso de un reactivo de unión específica marcado conjugado con una molécula radiactiva, fluorescente o absorbente de la luz, el reactivo detector actúa simplemente como una solución de lavado que facilita la detección de la formación del complejo en la zona reactiva por lavado del reactivo marcado no unido.

Dos o más reactivos líquidos pueden estar presentes en un dispositivo, por ejemplo, un dispositivo puede comprender un reactivo líquido que actúa como un reactivo de lavado y un reactivo líquido que actúa como un reactivo detector y facilita la detección del analito.

Un reactivo líquido puede incluir además una cantidad limitada de un "inhibidor", es decir, una sustancia que bloquea el desarrollo del producto final detectable. Una cantidad limitada es una cantidad de inhibidor suficiente para bloquear el desarrollo del producto final hasta que la mayoría o todo el material no unido en exceso sea transporta lejos de la segunda región, momento en el que se produce producto final detectable.

Métodos de tratamiento, mejora o prevención de la enfermedad causada por *E. canis*

Un polipéptido de DIVA, polinucleótido o anticuerpo descritos en la presente se pueden usar para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*. Sin embargo, si un polipéptido de DIVA se usa para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*, por lo tanto no se podría usar como un polipéptido de DIVA para la detección y diferenciación de los animales infectados, no vacunados, y vacunados porque el sistema inmunológico de un animal vacunado reconocerían el antígeno de DIVA usado para la vacunación. Sin embargo, un polipéptido de DIVA que no reacciona de forma cruzada con los anticuerpos para el polipéptido de DIVA utilizado para el tratamiento, la mejora o la prevención de una enfermedad causada por *E. canis* todavía se puede usar como antígeno DIVA *E. canis*.

Por ejemplo, si la SEQ ID NO:2 o un fragmento de esta se usa como una vacuna, entonces la SEQ ID NOs:4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22 o sus combinaciones se pueden usar como un polipéptido de DIVA, si no reaccionan en forma cruzada con los anticuerpos específicos para la SEQ ID NO:2. En consecuencia, los polipéptidos de DIVA, polinucleótidos, y anticuerpos se pueden usar de dos maneras diferentes: (1) como composiciones para la prevención, tratamiento o mejora de una enfermedad o infección causada por *E. canis*; y (2) como un antígeno DIVA de *E. canis* para la detección y diferenciación de los animales que están vacunados; no vacunados; infectados o no infectados con *E. canis*.

Los polipéptidos, polinucleótidos, y anticuerpos se pueden usar para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*. Por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal o fragmentos de este, se pueden administrar a un animal, tal como un ser humano. En una forma de realización un anticuerpo o fragmento de

este se administra a un animal en una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo o fragmentos de este. Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad efectiva para aliviar los síntomas de la infección con *E. canis* o la reducción de la cantidad de organismos de *E. canis* en un sujeto.

5 Los polipéptidos de la invención o polinucleótidos pueden estar presentes en una composición inmunogénica y se usa para inducir una respuesta inmune en un huésped. Una composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmune en un animal. Una composición del polipéptido inmunogénico de la invención o composición de polinucleótido es particularmente útil para la sensibilización del sistema inmunitario de un animal de modo que, como resultado, se produce una respuesta inmune que mejora o previene el efecto de la infección con *E. canis*. La inducción de una respuesta inmune en un modelo animal puede ser útil para determinar, por ejemplo, dosis óptimas o vías de administración. La inducción de una respuesta inmune también se puede usar para tratar, prevenir o mejorar una enfermedad o infección causada por *E. canis*. Una respuesta inmune incluye las respuestas inmunes humorales o respuestas inmunes mediadas por células, o una combinación de estas. Una respuesta inmune también puede comprender la promoción de una respuesta del huésped generalizada, por ejemplo, mediante la promoción de la producción de defensas.

La generación de un título de anticuerpos por un animal contra *E. canis* puede ser importante en la protección contra la infección y la eliminación de la infección. La detección y/o cuantificación de los títulos de anticuerpos después de la administración de un polipéptido o polinucleótido se puede usar para identificar epítopos que son particularmente efectivos en la obtención de los títulos de anticuerpos. Los epítopos responsables de una fuerte respuesta de anticuerpos a *E. canis* se pueden identificar mediante la obtención de anticuerpos dirigidos contra polipéptidos de *E. canis* de diferentes longitudes. Los anticuerpos obtenidos por un epítipo de polipéptido particular, entonces se pueden probar usando, por ejemplo, un ensayo ELISA para determinar cuáles polipéptidos contienen epítopos que son más efectivos para la generación de una respuesta potente. Los polipéptidos o proteínas de fusión que contienen estos epítopos o los polinucleótidos que codifican los epítopos se pueden construir y usar para provocar una respuesta de anticuerpo potente.

Un polipéptido, o un polinucleótido o anticuerpo de la invención se pueden administrar a un mamífero, tal como un ratón, conejo, cobayo, macaco, babuino, chimpancé, ser humano, vaca, oveja, cerdo, caballo, perro, gato, o a animales tales como pollos o patos, para obtener anticuerpos in vivo. La inyección de un polinucleótido tiene las ventajas prácticas de la simplicidad de construcción y modificación. Además, la inyección de un polinucleótido produce la síntesis de un polipéptido en el huésped. Por lo tanto, el polipéptido se presenta al sistema inmune del huésped con modificaciones postraduccionales nativa de la estructura y la conformación. Un polinucleótido se puede administrar a un sujeto como un "ADN desnudo".

La administración de un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, que incluye inyección intramuscular, intravenosa, intrapulmonar, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, o subcutánea, aerosol, intranasal, bomba de infusión, supositorio, en mucosa, tópica, y oral, incluyendo la inyección con una pistola balístico biológica ("pistola de genes"). Un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo puede estar acompañado de un portador proteico para la administración oral. Una combinación de métodos de administración también se puede utilizar para provocar una respuesta inmune. Los anticuerpos se pueden administrar en una dosis diaria de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg. En una forma de realización los anticuerpos se administran a una dosis diaria de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg.

Los portadores farmacéuticamente aceptables y diluyentes para uso terapéutico son bien conocidos en la técnica y se describen en, por ejemplo, Pharmaceutical Sciences de Remington, Mack Publishing Co. (A.R. German) ed. (1985)). El portador no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el huésped. Tales portadores incluyen, pero sin limitación, macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos tales como Sepharose® funcionalizado con látex, agarosa, celulosa, perlas de celulosa y similares, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos tales como ácido poliglútamico, polilisina, y similares, copolímeros de aminoácidos, peptoides, lipitoides y partículas de virus no virulentas inactivas, o células bacterianas. Los liposomas, hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, y bioadhesivos se pueden usar también como un portador para una composición de la invención.

Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden usar en composiciones de la invención, por ejemplo, sales minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, o benzoatos. Los sustratos proteicos especialmente útiles son albúminas séricas, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la técnica. Las composiciones de la invención también pueden contener líquidos o excipientes, tales como agua, solución salina, solución salina regulada con fosfato, solución de Ringer, solución de Hank, glucosa, glicerol, dextrosa, maltodextrina, etanol, o similares, solos o en combinación, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de ajuste de tonicidad, detergente, o agentes reguladores de pH. También se pueden usar agentes activos adicionales, tales como agentes bactericidas.

Si se desea, las moléculas coestimuladoras, que mejoran la presentación del inmunógeno a los linfocitos, tales como

B7-1 o B7-2, o citoquinas tales como MIP1 α , GM-CSF, IL-2, e IL-12, se pueden incluir en una composición de la invención. Opcionalmente, los adyuvantes también se pueden incluir en una composición. Los adyuvantes son sustancias que se pueden usar para aumentar de forma no específica una respuesta inmune específica. En general, un adyuvante y un polipéptido de la invención se mezclan antes de la presentación al sistema inmune, o se presentan por separado, pero se presentan en el mismo sitio del animal. Los adyuvantes pueden incluir, por ejemplo, adyuvantes oleosos (por ejemplo, adyuvantes completo e incompleto de Freund), sales minerales (por ejemplo, Al₂(SO₄)₃; AlNa(SO₄)₂, AlNH₄(SO₄), sílice, alumbre, Al(OH)₃, y Ca₃(PO₄)₂), polinucleótidos (es decir, ácidos poliic y poli AU), y ciertas sustancias naturales (por ejemplo, cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, así como sustancias que se encuentran en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* y miembros del género *Brucella*). Los adyuvantes que se pueden usar incluyen, pero sin limitación MF59-0, hidróxido de aluminio, N-acetil-muramil-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramil-L-alanil-D-isoglutamina (CGP 11637), denominada nor-MDP), N-acetilmuramil-L-alanil-D-isoglutaminil-L-alanina-2-(r-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforiloxi)-etilamina (CGP 19835 A, denominado como MTP-PE), y PJB1, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforil lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de escualeno 2%/TWEEN® 80.

Las composiciones de la invención se pueden formular en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, formulaciones inyectables, enjuagues bucales, dentífricos, y similares. El porcentaje de uno o más polipéptidos de la invención, o polinucleótidos, o anticuerpos en tales composiciones y preparaciones puede variar de 0,1% a 60% del peso de la unidad.

La administración de polipéptidos, polinucleótidos, o anticuerpos puede provocar una respuesta inmune en el animal que dura al menos 1 semana, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 años, o más. Opcionalmente, una respuesta inmune se puede mantener en un animal mediante la provisión de una o más inyecciones de refuerzo del polipéptido, polinucleótido, o anticuerpos a 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 par, o más después de la inyección primaria. Si se desea, las moléculas coestimuladoras o adyuvantes también se pueden proporcionar antes, después o junto con las composiciones.

Una composición que comprende un polipéptido, polinucleótido, anticuerpo, o una combinación de estos se administra de una manera compatible con la composición particular utilizada y en una cantidad que es efectiva para provocar una respuesta inmune que se detecta, por ejemplo, por un ELISA. Un polinucleótido se puede inyectar por vía intramuscular a un mamífero, tal como un mandril, chimpancé, perro, o humano, a una dosis de 1 ng/kg, 10 ng/kg, 100 ng/kg, 1.000 ng/kg, 0,001 mg/kg, 0,1 mg/kg, o 0,5 mg/kg. Un polipéptido o anticuerpo se pueden inyectar por vía intramuscular a un mamífero en una dosis de 0,01, 0,05, 0,5, 0,75, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 5 o 10 mg/kg.

Los polipéptidos, polinucleótidos, o anticuerpos, o una combinación de estos se pueden administrar a un animal que no está infectado con *E. canis* o se pueden administrar a un animal infectado con *E. canis*. Las dosis particulares de polinucleótidos, polipéptidos o anticuerpos en una composición dependerá de muchos factores que incluyen, pero sin limitación la especie, edad, género, medicación concurrente, estado general del mamífero al que se administra la composición, y el modo de administración de la composición. Una cantidad efectiva de la composición de la invención se puede determinar fácilmente utilizando solo experimentación de rutina.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

40 Preparación de *E. canis* muertos con formalina para la inmunización en perros

E. canis se cultivó en cultivo celular canino usando métodos descritos en la bibliografía. Ver, por ejemplo, Breitschwerdt, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, Vol 42:362-368. Mediante el uso de microscopía óptica, se estimó que las células O30 está más de 80% infectadas por *E. canis*. Se recogieron dos litros de cultivo de células infectadas por *E. canis*, se centrifugaron y el pellet retenido produjo 7,31 g de material (peso húmedo). Se presume que el agua componía el 80% del peso del material, lo que da un peso seco estimado de 1,462 gm (20% del peso del material). El pellet celular se resuspendió a 20 mg/ml en PBS (peso seco) para un volumen total de 73 ml.

A este pellet celular resuspendido, se añadieron 0,73 ml de solución de formalina (Sigma Catalog HT50-1-2 solución de formalina 10%, regulada neutra) para una concentración de formaldehído final de 0,04%. La solución se agitó durante la noche a 4 °C. La mezcla inactivada se centrifugó y el pellet celular se retuvo. El pellet se lavó por resuspensión en 250 ml de PBS. El material se recolectó por centrifugación y el lavado se repitió una vez.

El pellet de células lavado se resuspendió en 73 ml de PBS. La muestra se dividió en alícuotas en viales de tapa de rosca 73 y se congeló a -80 °C. Cada vial contiene 20 mg (peso seco) de cultivo de células de *E. canis* inactivadas con formalina, adecuados para la combinación con el adyuvante apropiado para la inmunización en animales.

55

Ejemplo 2**Preparación de *E. canis* fijadas con formalina con dos adyuvantes diferentes, protocolo para la inmunización de beagles con el antígeno *E. canis* y análisis de los sueros de los beagles inmunizados usando SNAP® 3Dx®.**

5 La preparación de antígeno con adyuvante de hidróxido de aluminio es una técnica bien conocida por los expertos en la materia. Por ejemplo, ver "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Press, 1988, pp 99.

10 Para la inmunización en perros (beagles de laboratorio), se prepararon dos conjuntos de dosis con adyuvante de hidróxido de aluminio preparado como se describió anteriormente y dos conjuntos de dosis se prepararon con adyuvante de Ribí (Corixa Corp., Seattle WA) utilizando el protocolo descrito por el fabricante. Cada dosis contenía aproximadamente 20 mg de cultivo de células *E. canis* inactivadas con formalina de (peso seco).

15 Se seleccionaron beagles de laboratorio mantenidos en la perrera para la inmunización con antígenos inactivados con formalina de *E. canis*. Dos grupos de dos perros cada uno; cada grupo usando un adyuvante diferente se trataron con la preparación de *E. canis* fijadas con formalina (óxido de aluminio o Ribí). En el día 0, se halló que los 4 perros eran seronegativos usando el diagnóstico SNAP® 3Dx® así como el análisis de transferencia de Western usando organismos de *E. canis*.

20 El comité IACUC de Covance Research Products Inc. aprobó el protocolo para la inmunización de los beagles de laboratorio. Los perros se estimularon en los días 0, 28 y 56, se controlan con extracciones de sangre semanales de 1 ml usando SNAP® 3Dx®. A todos los perros se les administró por vía subcutánea el artículo de prueba apropiado en la zona dorsoescapular. Los cuatro animales presentaron seroconversión a una prueba positiva en SNAP® 3Dx® *E. canis* en el día 42. Se tomaron sangrados de producción en los días 42 y 70 (aproximadamente 50 ml de sangre que produjo aproximadamente 25 ml de suero).

25 La Figura 1 muestra la evaluación del ensayo SNAP® 3Dx® de beagles de laboratorio. Se utilizó el dispositivo SNAP® como describe el fabricante. La muestra "Pre" es desde el día 0. La muestra "post" es la muestra desde el día 42. La mancha positiva de *E. canis* es positiva los 4 perros para la muestra del día 42. Se observaron resultados similares para la muestra del día 70.

30 Los experimentos con una tercera vacuna que comprende un tercer adyuvante, BCG, (Calbiochem de EMD Biosciences, Inc. San Diego, CA) revelaron resultados similares. La preparación de la tercera vacuna fue idéntica a las preparaciones descritas para la vacuna con adyuvante Ribí descrita anteriormente, excepto: 1) inactivación con formalina fue durante 24 horas a 4 °C, y 2) se añadió 1 mg de BCG. El esquema de vacunación fue el día 0, día 14, se extrajo sangre en forma semanal y se analizó para determinar la reactividad con proteínas de *E. canis*.

Ejemplo 3**Enriquecimiento de *E. canis* del cultivo celular usando gradientes PERCOLL®.**

35 Para el aislamiento de ADN y análisis de transferencia Western, *E. canis* fue enriquecido a partir del cultivo celular utilizando gradientes de densidad de PERCOLL®. El proceso de aislamiento de los patógenos intracelulares del cultivo de células, tales como Ehrlichia, es una técnica bien conocida para los expertos en la materia. Por ejemplo, ver Akira et al. (1982) Purification of Rickettsia tsutsugamushi by PERCOLL® density gradient centrifugation, Microbiol. Immunol., 26:321-328.

40 Un enriquecimiento típico de *E. canis* se inició con 1,5 litros de cultivo de células infectadas (ver anteriormente). Las células se centrifugaron 6000 x g, se retuvo el pellet celular y el sobrenadante se descartó. El pellet celular se resuspendió en 20 ml de PBS que fue seguido de una segunda centrifugación. El sobrenadante se descartó y se retuvo el sobrenadante. Después, el pellet se resuspendió en 20 ml de PBS, se sometió a sonicación durante 5 segundos a 20 kHz, la potencia se ajusta 1,5 usando un sonicador Branson. La muestra luego se centrifugó a 500 x g durante 5 minutos para sedimentar residuos grandes.

45 Se añadió PERCOLL® al sobrenadante a una concentración final de 32% (4,5 ml de PERCOLL® con 10 ml de muestra). La muestra se cargó en tubos de Oak Ridge compatibles con un rotor de 70 I Ti y se centrifugó durante 30 minutos a 63.000 x g. La banda opaca se recogió usando una pipeta Pasteur. La banda opaca es altamente por Ehrlichia (confirmado mediante la microscopía óptica de la muestra recolectada). Después de una dilución 1: 4 con PBS, la muestra se dividió en alícuotas y se centrifugó a 12.000 x g. El sobrenadante se descartó y el sedimento de Ehrlichia se almacenó a -80 °C.

Ejemplo 4**Análisis de suero o plasma de perros expuestos e infectados por transferencia Western**

El uso de análisis en gel de SDS-PAGE 1-dimensional y análisis en gel de 2 dimensiones (primera dimensión isoelectroenfoque, segunda dimensión SDS-PAGE) es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, ver Current Protocols in Molecular Biology, eds. F. M. Ausubel et al., John Wiley & Sons Inc., 1997, páginas 10.2.2-

10.3.11. El uso de las transferencias de Western para analizar las proteínas separadas por medio de estos métodos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, ver Current Protocols in Molecular Biology, eds. F. M. Ausubel et. al., John Wiley & Sons Inc., 1997, páginas 10,8.1-10,8.116.

5 El trabajo inicial se realizó mediante análisis de Western de las proteínas separadas con los geles 1D (datos no mostrados), seguido por análisis de Western de proteínas separadas usando los geles 2D. Las proteínas de *E. canis* recolectadas del cultivo de células se analizaron usando electroforesis en gel 2D (materiales y reactivos usados como describe el fabricante; Bio-Rad Life Sciences Research, Hercules, CA 94547). La cantidad de muestra para cargar por gel se determinó empíricamente (ver Figura 2). Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y se analizaron usando sueros caninos de beagles de laboratorio en el día 0, los perros se expuestos al antígeno de *E. canis* fijado en formalina (ver más arriba), o sueros de animales infectados con *E. canis* (ver Figuras 3, 4 y 5).

Los sueros y plasmas caninos positivo se aislaron de perros infectados con *E. canis*. La infección con *E. canis* se verificó mediante análisis Western de linfocitos recolectados de sangre entera de estos perros, y se confirmó por el uso del ensayo IDEXX SNAP®Dx® con sueros o plasmas caninos (disponible comercialmente de IDEXX Laboratories Inc., que se utiliza como describe el fabricante).

15 Para el análisis de transferencia Western, las proteínas se separaron usando geles 1D SDS-PAGE o 2D isoelectroenfoque/SDS-PAGE seguido de electro-transferencia de las proteínas de los geles a la nitrocelulosa. Las transferencias de nitrocelulosa se incubaron en una solución de bloqueo de leche en polvo no grasa 2,5% disuelta en solución salina regulada con Tris (pH 7,5), Tween® 20 0,05%. Los sueros o plasmas caninos se diluyeron al título tal como se describe en el buffer que contiene un lisado de *E. coli* para bloquear la unión no específica con sueros de ternero normal de 30% y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4 °C no específica. Después de lavar 3 veces en TBS-TWEEN® (0,05%), las transferencias se transfirieron en un buffer que contiene suero de ternera fetal 50%, TBS-Tween © Kathon 50% (0,05% y 0,5%, respectivamente) para evitar la unión no específica de un anticuerpo policlonal anti-Fc canino de conejo conjugado con peroxidasa de rábano (Jackson Immuno Research, West Grove, PA 19390). El conjugado de anticuerpo policlonal anti-Fc canino de conejo se diluyó 1: 5000. Los geles se lavaron 3 veces con TBS TWEEN® (0,05%), una vez con TBS, y la presencia de HRP se detectó usando reactivos de detección de transferencia Western ECI (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 08855-1.327) utilizado como describe el fabricante. Las imágenes digitales de una película de rayos X expuesta se capturaron usando una GelDoc 2000 (Bio-Rad Inc.).

Ejemplo 5

30 **Aislamiento de ADN de *E. canis* y construcción de una biblioteca de expresión lambda y análisis de la biblioteca de expresión lambda de *E. canis* para determinar clones que tienen actividad de DIVA.**

La preparación y análisis de las bibliotecas de expresión de lambda es una técnica bien conocida para los expertos en la materia. Por ejemplo, ver Current Protocols in Molecular Biology, eds. F. M. Ausubel et al., John Wiley & Sons Inc., 1997, páginas 5.1 a 5.8.6. Para la construcción de la biblioteca de expresión, se purificó el ADN genómico de *E. canis* aislado del cultivo de células por centrifugación en gradiente de PERCOLL® (ver arriba). El ADN se purificó usando un kit de purificación de ADN genómico de Qiagen Sciences (Germantown, MD). Se usó un kit del vector EcoRI/CIAP predigerido Lambda ZAP® II (Stratagene Corp., La Jolla, CA 92037) como específica el fabricante para la construcción de la biblioteca. El ADN genómico de *E. canis* se digirió parcialmente con TSP509 y se aislaron fragmentos que varían de 2 hasta 6 kb mediante electroforesis en gel de agarosa y se ligó en el vector lambda. Los fagos se empaquetaron y cultivaron como especifica el fabricante.

Se analizaron aproximadamente 120.000 placas lambda individuales para determinar la unión a sueros aislados de perros identificados como positivos para la infección con *E. canis*, pero negativos para reactividad con sueros de animales expuestos a un *E. canis* cultivado en cultivo celular (ver anteriormente). De la prueba inicial se identificaron 84 placas individuales como portadoras de actividad.

45 Las placas lambda se sometieron a dos rondas de purificación en placa y analizaron de nuevo para verificar la reactividad positiva con sueros de animales infectados con *E. canis*, de reactividad negativa cuando se analizaron con sueros de los animales expuestos.

Las placas lambda aislados se analizaron para determinar la reactividad cruzada con sueros de animales identificados como seropositivos para *Anaplasma phagocytophilia*, *Borrelia burgdorferi* (agente causante de la enfermedad de Lyme), *Rickettsia rickettsii* (agente causante de la fiebre de las Montañas Rocosas), *Leptospira interrogans* y *Dirofilaria imunitis* (agente causante del parásito del corazón canino).

Al final del proceso de análisis, se halló que 43 placas lambda reaccionan con los sueros de los animales infectados con *E. canis* que no reaccionaron con los sueros expuestos o sueros de perros infectados con otros patógenos caninos (ver anteriormente).

55 Usando la característica ZAP® del vector de clonación de acuerdo con las instrucciones del fabricante, los insertos en el vector lambda se convirtieron en plásmidos. Los plásmidos se transformaron en la cepa de *E. coli* XL-1 azul para la expresión de las proteínas y el análisis de las proteínas codificadas por transferencia Western. Los extremos

de los insertos de ADN de *E. canis* se sometieron a análisis de la secuencia de ADN usando los cebadores de secuenciación T7 y T3.

La información de secuencia de las reacciones T7 y T3 para los 43 clones se sometió a un análisis de BLAST en el sitio web NCBI. Los resultados se tabularon en un formato de Excel. Sobre la base de la identidad de secuencia entre el clon y la secuencia del genoma aleatoria disponibles para *E. canis* (NCBI: NZ_AAEJ01000001), se identificaron segmentos de ADN genómico de cada clon. Los clones individuales que comparten genes comunes se agruparon para su posterior análisis por transferencia Western usando mezclas de sueros caninos infectados y expuestos a bacterias. Sobre la base de los patrones de bandas similares, se eliminaron los clones duplicados. Se eliminaron todos los clones que muestran reactividad para los dos conjuntos de sueros. Como resultado de este análisis, se seleccionaron 23 clones para una evaluación adicional. La agrupación de los clones y el antígeno común por grupo se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1.

Antígeno común	Número de clon
antígeno 120 kDa	2, 10, 17, 33, 35, 79
Proteínas de shock térmico	4, 9, 24, 66
ATPasa	7, 84
Proteína ribosómica L1	21, 47, 65
Antígeno 200 kDa	26, 55, 76
Proteína hipotética	75
Piruvato deshidrogenasa	5
Proteína ribosómica (50S)	6
Desconocido	57
Regulador transcripcional	82

Ejemplo 6

15 Análisis de transferencia Western usando muestras de suero canino *E. canis* positivo individuales

Los 23 clones se analizaron en geles de SDS-PAGE individuales. Cada gel se transfirió a nitrocelulosa y se sometió a transferencia Western utilizando muestras individuales de suero canino de perros que solo fueron positivos para las infecciones con *E. canis* mediante pruebas ELISA/SNAP®. El suero canino se diluyó 1:500 en el mismo diluyente descrito en el Ejemplo 4 que contiene lisado de *E. coli* y se detectó la reactividad usando técnicas de peroxidasa de rábano colorimétricas estándares (Opti-4CN, Bio-Rad). Se evaluó un total de trece muestras de suero canino individuales. Las transferencias se compararon entre las muestras para determinar el número de perros que muestran reactividad a una banda predominante o conjunto de bandas por clon. Los resultados se resumen en la Tabla 2 y la Figura 6 (los clones enumerados en negrita se representan en la figura).

Tabla 2.

Antígeno común	Número de clon	Reactores positivos
Antígeno 120 kDa	2, 10, 17, 33, 35	13/13
Proteínas de shock térmico	9	12/13
ATPasa	7, 84	12/13
Proteína ribosómica L1	21, 47, 65	12/13
Antígeno 200 kDa	26, 55, 76	12/13

Los 23 clones también se analizaron por transferencia Western usando suero canino mezclado que habían dado positivo en otras enfermedades infecciosas transmitidas por vectores. Se evaluaron las muestras que dieron positivo

por ELISA o SNAP® para las siguientes infecciones individuales: parásito del corazón, Lyme, *Anaplasma Phagocytophilum*, o *E. ewingii*. Ninguno de los clones identificados en la tabla anterior mostró reactividad cruzada con sueros caninos positivo para estas otras infecciones transmitidas por vectores.

Ejemplo 7

5 Identificación de segmentos génicos relevantes que codifican los antígenos DIVA de *E. canis*.

a. antígeno 120 kDa

Este antígeno fue descrito anteriormente por Yu et al. (J Clin Microbiol. 2000 Jan;38(1):369-74; ver también, McBride et al., 2000 Infec. Immun. 68:13) y se demostró que es útil en el diagnóstico de las infecciones por *E. canis* en perros. Este antígeno se ha descrito como antígeno de *E. canis* "p120" y "p140". Ver, id. Yu et al. explican que una proteína recombinante expresada por el gen p120 tiene un tamaño molecular de 1401 (13a en un gel de dodecil-sulfato de sodio, que es mayor que la masa molecular predicha de la proteína. Ver, Yu et al., página 373. The Walker group (Yu et al., y McBride et al.) se refieren a la proteína tanto p120 como p140 de *E. canis*. Por lo tanto, esta descripción utiliza p120 y p140 indistintamente para describir esta proteína. El número de acceso para el gen de p120/140 de *E. canis* es AF112369 y la proteína asociada es AAD34330. Ver también, el acceso N.º YP302666. Los clones 2, 10, 17 y 33 contienen segmentos de longitud completa del gen del antígeno 120 kDa. El clon 35 puede contener un truncamiento de este gen. (Ver, SEQ ID NOs: 1 y 2).

Este gen se amplificó a partir de ADN genómico de *E. canis* y se subclonó en un sistema de expresión pET con una marca 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con la secuencia del gen que codifica la proteína mostrada en la SEQ NO:ID 2, desde los aminoácidos 58 a 589. Los lisados de proteínas de las bacterias BL21 inducidas para expresar esta proteína se analizaron por transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con transferencias Western analizadas con sueros de animales expuestos a organismos de adaptados en cultivo. En consonancia con los resultados anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron esta proteína del peso molecular esperado (datos no mostrados).

P120 tiene un motivo de 36 aminoácidos que se repite 14 veces. Ver, SEQ ID NO: 15. La porción repetida (región subrayada en la SEQ ID NO: 15 es un péptido de 60 kD). La SEQ ID NO: 16 muestra las 14 repeticiones alineadas. La SEQ ID NO: 17 muestra la secuencia de consenso de las 14 repeticiones.

Una forma de realización proporciona un polipéptido que comprende:

KEEX₁TPEVX₂AEDLQPAVDX₃SX₄EHSSSEVGX₅KVXS₆TS (SEQ ID NO:17).

30 donde X₁ = S o N

X₂ = K o R

X₃ = G, D, o S

X₄ = V o I

X₅ = E o K

35 X₆ = E o K

Otra forma de realización de la invención proporciona un polipéptido multimérico donde la SEQ ID NO:17 se repite dos o más veces. El polipéptido multimérico también puede comprender uno o polipéptidos heterólogos.

En otra forma de realización, la invención proporciona un polipéptido de la SEQ ID NO:21, XPEVKAEDLQPAVDGSEVHX, donde cada una de las X tiene = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15 aminoácidos.

En otra forma de realización, la invención proporciona un polipéptido de la SEQ ID NO:22, CKEESTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGXKVSETS; donde X = K o E.

b. Antígeno 200 kDa

Este antígeno fue descrito anteriormente por McBride et al. (J Clin Microbiol 2001 Jan; 39(1):315-22) y se demostró que es útil en el diagnóstico de ehrlichiosis. El número de acceso para este gen es AF252298 y AAK01145 la proteína asociada. Una porción de esta secuencia de la proteína se asocia con una patente publicada (SEQ ID NO: 2 de Patente U.S. N.º 6.355,777, número de acceso AAE96254). Los autores han identificado una región diferente de esta proteína que sirve como antígeno de diagnóstico para la ehrlichiosis y un reactivo DIVA. La porción del gen se extiende desde el nucleótido 1081 de AF252298 hasta el nucleótido final 4266. (Ver SEQ ID NOs: 3 y 4).

50 Este gen se amplificó a partir de ADN genómico de *E. canis* y se subclonó en un sistema de expresión pET con una

marca 6-His acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente la secuencia del gen que codifica la proteína mostrada en SEQ ID NO: 4, desde los aminoácidos 1 a 1061. Los lisados de proteínas de las bacterias BL21 inducidos para expresar esta proteína se analizaron por transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con las transferencias Western analizadas con sueros de animales expuestos a organismos adaptados en cultivo. En consonancia con los resultados anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron esta proteína del peso molecular esperado (datos no mostrados).

c. ATPasa

Este gen (marca del Locus "Ecan02000699") ha sido predicho por análisis computacional automatizado de la secuencia del genoma aleatoria de *E. canis*. Esta codifica una proteína de más de 4000 amino ácidos (ZP_00210575). La prueba de DIVA de *E. canis* identificó dos regiones separadas de este gen y su proteína asociada como antígenos inmunodominantes potenciales y los reactivos DIVA. Los segmentos de la proteína identificada en los clones 84 y 7 son los aminoácidos 1984-2774 y 2,980-3,740, respectivamente, de número de acceso 46308382. (Ver SEQ ID NOs: 5, 6, 7, 8).

Ambos fragmentos de este gen se amplificaron a partir de ADN genómico de *E. canis* y se subclonaron por separado en un sistema de expresión pET con una marca 6-His tag de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con las secuencias de genes asociados con las proteínas que se muestran SEQ ID NOs: 6 y 8, desde los aminoácidos 1 a 782 y 1 a 746, respectivamente. Los lisados de proteína de bacterias BL21 inducidos para expresar estas proteínas se analizaron por transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con transferencias Western analizadas con sueros de animales expuestos a los organismos adaptados en cultivo. En consonancia con los resultados anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron o estas proteínas del peso molecular esperado (datos no mostrados).

d. Proteínas de shock térmico

Aunque este clon contenía un gen para la proteína de shock térmico, GrpE, la secuencia del gen que codifica el antígeno inmunodominante surge de una secuencia de proteína hipotética predicha por el análisis computacional automatizado del genoma. Sobre la base del peso molecular y pI de la proteína, el gen de interés en el clon 9 es el locus número "Ecan02000495" y la proteína asociada 46308954.

Debido a que esta proteína solamente se predice a partir de la anotación de computadora del genoma y no se ha identificado previamente a partir de los organismos de *E. canis* como una proteína inmunodominante, esta es la primera evidencia de que este gen se expresa en *E. canis* y estimula una respuesta inmune en el huésped canino infectado. La proteína se identificará como antígeno p16 (ver SEQ ID NO: 9 y 10).

Este gen se amplificó a partir del vector pBluescript que contiene el ADN genómico de interés y se subclonó en un sistema de expresión pET con una marca 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidieron exactamente con la secuencia del gen asociado con el número de locus "Ecan02000495". Los lisados de proteínas de las bacterias BL21 inducidos para expresar esta proteína se analizaron por transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con las transferencias Western analizadas con sueros de animales expuestos con organismos adaptados en cultivo. En consonancia con los resultados anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron esta proteína del peso molecular esperado (véase la Figura 7).

e. Proteína ribosómica LI

Este gen se identifica por la marca del locus "Ecan02000476" del genoma de *E. canis*. La proteína asociada tiene el número de acceso ZP_00211130 (ver SEQ ID NOs: 11 y 12). La identificación de esta proteína se ha predicho sobre la base de análisis computacional automatizado del genoma. Un análisis BLAST de esta proteína revela que la secuencia es aproximadamente 70% idéntica a una proteína de superficie de *E. chaffeensis* (número de acceso 4894576).

La inmunorreactividad para la proteína de *E. chaffeensis* se ha informado previamente en Yu et al, (J Clin Microbiol 1999 Aug; 37 (8):. 2568-75). La proteína de *E. chaffeensis* (número de acceso 4894576) se denomina como el precursor de la proteína 106 kDa.

f. Antígenos no 120 kDa posibles

Dentro del fragmento genómico que contiene el gen para el antígeno de 120 kDa, otros genes están presentes que también pueden ser inmunodominantes y reactivos de DIVA. Por ejemplo, el clon 10 produce un patrón de bandas diferente en transferencias Western analizadas con sueros infectados, en comparación con los clones que contienen el antígeno de 120 kDa solo. El clon 10 contiene la información genética para los componentes VirD4 de una vía secretora de tipo IV y esta secuencia génica se identifica con la marca del locus "Ecan02000624". Este gen codifica una proteína de 723 aminoácidos (ZP 00211244), pero solo una porción de esta proteína parece ser expresada por

el clon 10, como se determina por el peso molecular de la proteína identificada en el gel (ver SEQ ID NOs: 13 y 14).

Ejemplo 8

Evaluación de péptidos P140 de *E. canis*

5 Los sueros de beagles inmunizados con *E. canis* fijados en formalina (muestras de vacuna) de *E. canis* se analizaron usando un inmunoensayo basado en la placa de microtitulación preparada usando péptidos sintéticos derivados de la proteína p140 de *E. canis* (también conocido como p120, ver el Ejemplo 7).

10 La preparación de *E. canis* fijado con formalina y la inmunización de beagles se describieron en los Ejemplos 1 y 2. Las muestras de beagles inmunizados se analizaron usando inmunoensayos basados en la placa de microtitulación preparada usando péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID N°: 20) en formatos de ensayos indirectos y directos.

Formato de ensayo indirecto

15 Las muestras se analizaron usando inmunoensayos basados en placa de microtitulación preparadas usando los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20). Los péptidos individuales se inmovilizaron en los pocillos de microtitulación por adsorción directa. Se añadió una dilución de la muestra de prueba (1:100) al pocillo de microtitulación y el anticuerpo no unido se eliminó por lavado. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado se detectó por reacción con un conjugado anti-especie, en este caso, canino, de peroxidasa de rábano (HRPO) (dilución 1: 2000), el lavado y la adición de un sustrato HRPO. La absorbancia (A650) de los pocillos de microtitulación individuales se determinó usando un lector de placa de microtitulación.

Formato de ensayo directo

20 Los péptidos individuales (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20) se conjugaron a la albúmina de suero bovino y se inmovilizaron en los pocillos de microtitulación por adsorción directa. Los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20) se conjugaron con un reactivo indicador, peroxidasa de rábano (HRPO). La muestra de prueba y el péptido del inmunoensayo/indicador se añadieron a un pocillo de microtitulación recubierto con el péptido correspondiente, que se incubó y se lavó. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado y el péptido/reactivo indicador se detectó mediante la adición de un reactivo sustrato HRPO. La absorbancia (A650) de los pocillos de microtitulación individuales se determinó usando un lector de placas de microtitulación.

25 Los resultados del ensayo se muestran en la Tabla 3. El control positivo (PC, ID 1049: 16E) y control negativo (NC, 3818: 57B) eran muestras de suero positivo y negativo conocidas de *E. canis*, respectivamente. Todas las muestras se analizaron mediante la prueba SNAP® 4Dx® disponible en el comercio para el anticuerpo anti-*E. canis*. Los resultados para las muestras temporales secuenciales de 6 perros (CVYDEH, CWMBDC, CVXCSM, CWMAXK, CVSCVA y CVXCAP) que reciben el antígeno de *E. canis* tratado con formaldehído formulado usando diferentes adyuvantes se muestran para el día 0 hasta el día 42 después de la inmunización. Los resultados de la prueba SNAP® 4Dx® demuestran que se indujo una respuesta de anticuerpos en los animales vacunados. Ninguna de las muestras de suero de animales vacunados fue reactiva en el formato de ensayo directo. Varias muestras (por ejemplo, de perro CWMAXK) tenían altas reacciones de fondo en el formato de ensayo indirecto.

30 Los resultados demuestran que el anticuerpo inducido como resultado de la inmunización usando la vacuna fijada con formaldehído fue significativamente no reactiva para los péptidos sintéticos derivados de la proteína p140 de *E. canis*. (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20).

35 **Tabla 3.** Reacción de los sueros de perros inmunizados con antígeno de *E. canis* tratados con formaldehído medidos usando ensayos de microtitulación preparados usando péptidos derivados de la proteína p140 de *E. canis*. (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20).

Muestra	Resultado 4Dx® <i>E. canis</i>	Resultados de la placa indirecta (A650)			Resultados de la placa directa (A650)		
		SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20
1049:16E (PC)	0,72	2,071	2,075	1,867	2,049	1,821	1,495
3818:57B (NC)	N	0,051	0,058	0,050	0,034	0,033	0,035
CVYDEH día 0	N	0,050	0,062	0,045	0,034	0,034	0,035
día 7	N	0,048	0,052	0,042	0,033	0,032	0,036

ES 2 581 880 T3

día 14	N	0,051	0,055	0,048	0,036	0,034	0,038
día 21	N	0,044	0,062	0,051	0,035	0,034	0,040
día 28	0,04 (vw+)	0,054	0,073	0,055	0,036	0,033	0,034
día 35	0,07 (vw+)	0,049	0,058	0,047	0,033	0,035	0,039
día 42	N	0,051	0,059	0,053	0,034	0,035	0,040
CWMBDC día 0	0,08	0,054	0,085	0,082	0,035	0,033	0,038
día 7	0,20	0,064	0,078	0,072	0,038	0,035	0,035
día 14	0,30	0,058	0,081	0,085	0,038	0,033	0,040
día 21	0,24	0,051	0,101	0,078	0,037	0,040	0,039
día 28	0,22	0,049	0,082	0,073	0,034	0,036	0,033
día 35	0,17	0,043	0,068	0,081	0,033	0,040	0,035
día 42	0,11	0,044	0,071	0,074	0,031	0,034	0,031
CVXCSCM día 0	N	0,049	0,082	0,051	0,033	0,035	0,034
día 7	N	0,038	0,076	0,052	0,034	0,033	0,037
día 14	N	0,044	0,069	0,049	0,033	0,032	0,038
día 21	0,10 (w+)	0,038	0,054	0,045	0,035	0,035	0,036
día 28	0,10 (w+)	0,044	0,060	0,049	0,036	0,033	0,035
día 35	0,08 (vw+)	0,040	0,062	0,053	0,034	0,035	0,041
día 42	0,05 (vw+)	0,041	0,057	0,049	0,033	0,035	0,036
CWMAXK día 0	0,07 (vw+)	0,043	0,078	0,054	0,034	0,039	0,037
día 7	0,41	0,082	0,475	0,413	0,034	0,034	0,045
día 14	0,44	0,049	0,782	0,607	0,034	0,035	0,044
día 21	0,36	0,092	0,587	0,440	0,033	0,037	0,038
día 28	0,39	0,063	0,407	0,258	0,037	0,034	0,038
día 35	0,41	0,056	0,286	0,212	0,036	0,034	0,037
día 42	0,35	0,048	0,196	0,155	0,034	0,034	0,041
CVSCVA día 0	0,10 (w+)	0,039	0,084	0,084	0,033	0,033	0,038
día 7	0,37	0,040	0,107	0,066	0,032	0,032	0,036
día 14	0,14	0,053	0,151	0,062	0,035	0,033	0,039
día 21	0,33	0,057	0,131	0,072	0,035	0,033	0,034
día 28	0,29	0,049	0,104	0,058	0,035	0,034	0,036
día 35	0,36	0,043	0,108	0,079	0,034	0,039	0,040
día 42	0,32	0,047	0,117	0,044	0,033	0,036	0,037
CVXCAP día 0	N	0,041	0,065	0,040	0,032	0,035	0,032

día 7	0,34	0,058	0,106	0,068	0,036	0,033	0,033
día 14	0,30	0,087	0,150	0,112	0,034	0,035	0,039
día 21	0,35	0,065	0,120	0,086	0,039	0,036	0,041
día 28	0,19	0,054	0,103	0,059	0,035	0,036	0,032
día 35	0,18	0,046	0,092	0,047	0,033	0,033	0,039
día 42	0,19	0,051	0,067	0,047	0,035	0,035	0,038

Ejemplo 9

5 Los sueros de perros positivos y negativos para *E. canis* conocidos se analizaron usando un inmunoensayo basado en la placa de microtitulación preparada usando los péptidos sintéticos obtenidos a partir de la proteína p140 de *E. canis* (también conocido como p120, ver el Ejemplo 7).

Las muestras de campo positivas y negativas de *E. canis* se obtuvieron y se analizaron usando la prueba SNAP® 4Dx® para anticuerpos anti-*E. canis*. Las muestras luego se analizaron usando ensayos de formato de placa de microtitulación indirectos y directos producidos usando péptidos sintéticos derivados de la proteína P140 de *E. canis* (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20)

10 Formato de ensayo indirecto

15 Las muestras se analizaron usando inmunoensayos basados en placa de microtitulación preparadas usando péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20). Los péptidos individuales se inmovilizaron en pocillos de microtitulación por adsorción directa. Se añadió una dilución de la muestra de prueba (1:100) al pocillo de microtitulación y el anticuerpo no unido se eliminó por lavado. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado se detectó por reacción con un conjugado anti-especie, en este caso, canino, peroxidasa de rábano (HRPO) (dilución 1: 2000), el lavado y la adición de un sustrato HRPO. La absorbancia (A650) de los pocillos de microtitulación individuales se determinó usando un lector de placas de microtitulación.

Formato de ensayo directo

20 Los péptidos individuales (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20) se conjugaron a la albúmina de suero bovino y se inmovilizaron en los pocillos de microtitulación por adsorción directa. Los péptidos sintéticos (SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19 y SEQ ID NO: 20) se conjugaron con el reactivo indicador, peroxidasa de rábano (HRPO). La muestra de prueba y el péptido del inmunoensayo/ indicador se añadieron a un pocillo de microtitulación recubierto con el péptido correspondiente, que se incubó y se lavó. El anticuerpo unido al péptido inmovilizado y el péptido/reactivo indicador se detectó mediante la adición de un reactivo sustrato HRPO. La absorbancia (A650) de los pocillos de microtitulación individuales se determinó usando un lector de placas de microtitulación.

25 La Tabla 4 muestra los resultados para las muestras de campo positivas y negativas de *E. canis* usando el formato de ensayo indirecto. El control positivo (PC, ID 1049: 16E) y control negativo (NC, 3818: 57B) eran muestras de suero positivas y negativas de *E. canis* conocidas, respectivamente. Se determinó que las muestras eran anticuerpo anti-*E. canis* positivas o negativas usando la prueba de SNAP® 4Dx®. Los resultados del ensayo se muestran para los ensayos del formato de la placa de microtitulación obtenidos usando los reactivos peptídicos (SEQ ID:18, SEQ ID:19 y SEQ ID:20).

30 La Tabla 5 muestra los resultados para las muestras de campo positivas y negativas de *E. canis* usando el formato de ensayo directo. El control positivo (PC, ID 1049: 16E) y control negativo (NC, 3818: 57B) eran muestras de suero positivas y negativas de *E. canis* conocidas, respectivamente. Se determinó que las muestras eran anticuerpo anti-*E. canis* positivas o negativas usando la prueba de SNAP® 4Dx®. Los resultados del ensayo se muestran para los ensayos del formato de la placa de microtitulación obtenidos usando los reactivos peptídicos (SEQ ID:18, SEQ ID:19 y SEQ ID:20).

ES 2 581 880 T3

Tabla 4. Muestras de campo positivas y negativas de *E. canis* analizadas usando el formato de ensayo indirecto construido usando péptidos P140 (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20).

	Muestra	4Dx® Resultados	Absorbancia a 650 nM		
			SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20
	1049:16E (PC)		2,292	2,735	2,584
	3818:57B (NC)		0,051	0,065	0,045
EC+	HP 127	0,07	0,042	0,050	0,038
EC+	HP 143	0,08	2,867	2,825	2,731
EC+	HP 147	0,09	2,370	2,661	2,658
EC+	HP 151	0,21	2,176	2,093	2,535
EC+	HP 161	0,18	1,708	2,178	2,551
EC+	HP 165	0,08	2,690	2,492	2,525
EC+	HP 172	0,07	0,229	0,902	2,197
EC+	HP 185	0,38	2,497	2,622	2,704
EC+	HP 186	0,26	2,899	2,979	2,794
EC+	HP 188	0,40	2,482	2,578	2,898
EC+	HP 190	0,21	2,484	2,534	2,632
EC+	HP 192	0,18	1,473	2,132	2,526
EC+	HP 194	0,43	2,583	2,429	2,539
EC+	HP 197	0,22	2,150	2,239	2,537
EC+	HP 201	0,36	2,449	2,472	2,519
EC+	HP 206	0,10	2,477	2,247	2,549
EC+	HP 207	0,08	2,030	2,359	2,369
EC+	HP 209	0,20	0,262	0,218	1,102
EC+	HP 213	0,21	1,471	1,662	2,406
EC+	HP 215	0,19	2,144	2,431	2,721
EC-	HP 116	0,02	0,110	0,065	0,070
EC-	HP 119	0,02	0,102	0,091	0,079
EC-	HP 120	0,01	0,058	0,063	0,045
EC-	HP 121	0,02	0,054	0,064	0,057
EC-	HP 122	0,03	0,053	0,059	0,040
EC-	HP 124	0,02	0,055	0,061	0,052
EC-	HP 128	0,02	0,068	0,072	0,054
EC-	HP 129	0,02	0,056	0,057	0,044

ES 2 581 880 T3

EC-	HP 130	0,01	0,049	0,048	0,039
EC-	HP 131	0,01	0,051	0,053	0,043
EC-	HP 132	0,03	0,057	0,061	0,038
EC-	HP 134	0,02	0,059	0,084	0,114
EC-	HP 137	0,03	0,043	0,046	0,037
EC-	HP 138	0,01	0,055	0,063	0,048
EC-	HP 139	0,01	0,064	0,062	0,056
EC-	HP 140	0,00	1,574	2,444	2,491
EC-	HP 142	0,02	0,065	0,068	0,069
EC-	HP 144	0,02	0,080	0,079	0,081
EC-	HP 145	0,01	1,564	1,934	2,095
EC-	HP 148	0,01	0,037	0,043	0,043

Tabla 5. Muestras de campo positivas y negativas de *E. canis* analizadas usando el formato de ensayo directo construido usando péptidos P140 (SEQ 1D NO:18, SEQ ID NO:19 y SEQ ID NO:20).

Muestra		3Dx® SNAP S-Bkg	Absorbancia a 650 nM		
			SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:18	SEQ ID NO:18
1049:16E (PC)		0,72	2,753	2,079	2,018
3818:57B (NC)		Neg	0,034	0,035	0,036
1049:16A	<i>E. canis</i> pos	0,28	0,201	0,173	1,448
1049:16G	<i>E. canis</i> pos	0,50	0,034	0,034	0,039
1049:16Q	<i>E. canis</i> pos	0,39	2,308	1,933	2,151
1049:16U	<i>E. canis</i> pos	0,56	0,627	2,038	2,254
1061:03B	<i>E. canis</i> pos	0,49	0,083	0,338	0,889
1061:031	<i>E. canis</i> pos	0,27	2,766	2,593	1,646
1177:21D	<i>E. canis</i> pos	0,15	0,042	0,046	0,126
1177:21G	<i>E. canis</i> pos	0,41	1,087	1,675	1,835
1177:21K	<i>E. canis</i> pos	0,34	0,681	1,930	2,010
1177:630	<i>E. canis</i> pos	0,41	0,146	0,112	1,587
1183:85A	<i>E. canis</i> pos	0,49	2,768	2,757	2,476
1256:311	<i>E. canis</i> pos	0,23	0,044	0,086	0,143
813:91F	<i>E. canis</i> pos	0,41	1,239	1,570	1,993
813:911	<i>E. canis</i> pos	0,41	0,212	0,517	1,646
EC 10	<i>E. canis</i> pos	0,37	0,236	0,302	0,465

Los resultados demuestran que el anticuerpo inducido como resultado de la infección natural fue reactivo para los péptidos sintéticos derivados de la proteína p140 de *E. canis*. (SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 and SEQ ID NO:20).

Secuencias

SEQ ID NO:1 Secuencia nucleotídica del antígeno de 120kDa

5 ORIGEN

```

1 ATGGATATTG ATAACAATAA TGTGACTACA TCAAGTACGC AAGATAAAAAG TGGGAATTTA
61 ATGGAAGTGA TTATGCGTAT ATTAATTTTT GGTAATAATT CAGATGAGAA AGTAAGCAAT
121 GAAGACACTA AAGTTCTTGT AGAGAGTTTA CAACCTGCTG TGAATGACAA TGTAGGAAAT
181 CCATCAAGTG AAGTTGGTAA AGAAGAAAAT GCTCCTGAAG TTAAAGCGGA AGATTTGCAA
241 CCTGCTGTAG ATGGTAGTGT AGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGGAAAAA AGTATCTGAA
301 ACTAGTAAAG AGGAAAGTAC TCCTGAAAGT AAAGCAGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
361 GGTAGTATAG AACATTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTAAAAC TAGTAAAGAG
421 GAAAGTACTC CTGAAGTTAA AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGA TAGTGTGGAA
481 CATTATCAA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAACTA GTAAAGAGGA AAATACTCCT
541 GAAGTTAAAG CAGAAGATTT GCAACCTGCT GTAGATGGTA GTATAGAACA TTCATCAAGT
601 GAAGTTGGAG AAAAAGTATC TAAAAGTACT AAAGAGGAAA GTACTCCTGA AGTTAAAGCA
661 GAAGATTTGC AACCTGCTGT AGATGATAGT GTGGAACATT CATCAAGTGA AGTTGGAGAA
721 AAAGTATCTG AAAC TAGTAA AGAGGAAAAT ACTCCTGAAG TTAAAGCAGA AGATTTGCAA
781 CCTGCTGTAG ATGGTAGTGT GGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGGAAAAA AGTATCTAAA
841 ACTAGTAAAG AGGAAAGTAC TCCTGAAAGT AAAGCAGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
901 GATAGTGTGG AACATTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTGAAAC TAGTAAAGAG

961 GAAAATACTC CTGAAGTTAG AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGG TAGTGTAGAA
1021 CATTATCAA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAACTA GTAAAGAGGA AAGTACTCCT
1081 GAAGTTAAAG CAGAAGATTT GCAACCTGCT GTAGATAGTA GTATAGAACA TTCATCAAGT
1141 GAAGTTGGGA AAAAAGTATC TGAAACTAGT AAAGAGGAAA GTACTCCTGA AGTTAAAGCA
1201 GAAGATTTGC AACCTGCTGT AGATGGTAGT GTAGAACATT CATCAAGTGA AGTTGGAGAA
1261 AAAGTATCTG AAAC TAGTAA AGAGGAAAAT ACTCCTGAAG TTAAAGCAGA AGATTTGCAA
1321 CCTGCTGTAG ATGGTAGTGT AGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGGAAAAA AGTATCTGAA
1381 ACTAGTAAAG AGGAAAATAC TCCTGAAGTT AAAGCGGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
1441 GGTAGTGTAG AACATTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTGAAAC TAGTAAAGAA
1501 GAAAGTACTC CTGAAGTTAA AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGA TAGTGTAGAA
1561 CATTATCAA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAACTA GTAAAGAAGA AAGTACTCCT
1621 GAAGTTAAAG CGGAAGATTT GCAACCTGCT GTAGATGGTA GTGTGGAACA TTCATCAAGT
1681 GAAGTTGGAG AAAAAGTATC TGAGACTAGT AAAGAGGAAA GTACTCCTGA AGTTAAAGCG
1741 GAAGTACAGC CTGTTGCAGA TGGTAATCCT GTTCCTTTAA ATCCTATGCC TTCAATTGAT
1801 AATATTGATA CTAATATAAT ATTCATTAC CATAAAGACT GTAAAAAAGG TTCAGCTGTA
1861 GGAACAGATG AAATGTGTTG TCCTGTATCA GAATTAATGG CTGGGGAACA TGTCATATG
1921 TATGGAATTT ATGTCTATAG AGTTCAATCA GTAAAGGATT TAAGTGGTGT ATTTAATATA
1981 GATCATCTA CATGTGATTG TAATTTAGAT GTTTATTTG TAGGATACAA TTCTTTTACT
2041 AACAAAGAAA CAGTTGATTT AATATAA
    
```

SEQ ID NO:2 Secuencia proteica del antígeno de 120kDa

10 ORIGEN

```

1 MDIDNNNVTT SSTQDKSGLN MEVIMRILNF GNNSDEKVSN EDTKVLVESL QPAVNDNVGN
61 PSSEVGKEEN APEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGKVVSE TSKEESTPEV KAEDLQPAVD
121 GSIHSSSEV GEKVSKTSE ESTPEVKAED LQPAVDDSV EHSSEVGEKV SETSKEENTP
181 EVKAEDLQPA VDSIEHSSS EVGEKVS KESTPEVKA EDLQPAVDDS VEHSSEVGE
241 KVSETSKEEN TPEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGEKVS KESTPEV KAEDLQPAVD
301 DSVHSSSEV GEKVSETSKE ENTPEVRAED LQPAVDSVE HSSSEVGEKV SETSKEESTP
361 EVKAEDLQPA VDSIEHSSS EVGKVSSETS KESTPEVKA EDLQPAVDS VEHSSEVGE
421 KVSETSKEEN TPEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGEKVS ETSKEENTPEV KAEDLQPAVD
481 GSVHSSSEV GEKVSETSKE ESTPEVKAED LQPAVDDSV EHSSEVGEKV SETSKEESTP
541 EVKAEDLQPA VDSVEHSSS EVGEKVSSETS KESTPEVKA EVQPVADGNP VPLNPMPSID
601 NIDTNIIFHY HKDCKKGSV GTDEMCCPVS ELMAGEHVM YGIYVYRVQS VKDLSGVFNI
661 DHSTDCNLD VYFVGYNSFT NKETVDLI
    
```

SEQ ID NO 3 Secuencia nucleotídica del antígeno de 200kDa, desde posición 1081 hasta el final
ORIGEN

1 AATTTAGAT TTTGGACTTG TAGATGGAGA TGGTAAAAAT CCTTTACATC ATGCTGTTGA
61 ACATTTGCCA CCTGTTATAC TTAAGGGCGT AATGGACCAT GTAAAAAATA GTAGTGAGTT
121 TCAAGATTTA GTAAATGATC CTGATTATT TGGAAATACT ATAGCTCATT ATGCAGTTAA
181 GAATAAAAAT GCTGATTTAA CATTGTTTAA CATGCTGAAA GCTTCAGGAG CTGATTTAAA
241 TGTTAGGAAT GTAGTTGGTC GAGCTCCAAT ACATGTTGCT TCTTCTAATG GTAAGGCTAA
301 TGCAGTTTCT GGACTTGAT CATGTGGTAT TGACGTTAAT TCTCAAGATG TGAATGGAGA
361 TACACCACTT CATATTGCTG TTGAAGGCGG TAGTATGGAG ACGGTATTAG CAGTGTTAAA
421 TCAGAGAGGT GCTGATGTTA GTGTCCAGAA TAACGATGGA GTTACACCTA TGCTTAGTGC
481 TGCTAAATAT GGAGATATAG GTGTAATAAA AGCTTTAGGT TCAGCTAAAC CAAATATTA
541 AGGTGAAGAC ACTGTTGCTA AATCATTGCT GATGGAGGAT TACAAAGGTT TTACACCTT
601 GCATTTTGTA GCTGGTGGTG GTAGCAGAGA TACATTCCGT GTCGTAAGAA AAAATTATGA
661 AAAATGTCAT GACTTAGCTA CTATTAGGGC AGCTTTAATG CAAGATAGAA GTGGTGGTGA
721 GCTTGTAAT TTAGGGGATT TTGAAAGTGA AAATATATTG GGTTCCGCCAA ATGCAAAATT
781 CTTGCAGCAT ATTCAATCAG CAAATTTTGG TTTTCTCCA GCGCATTGTG CTATAGTATC
841 GTCTAATCAC AATGTAATGA AAGATATCTT AAATTTTGTG GGGGATTCGT TACACCTACC
901 AAGTGAGCGT GGGTATAATG CAATGCAGGT TGCTGCTTTG TTTGGTGACA AAGAAGCAGT
961 GAAAATGCTT CTAAGCCAAAG TGATCTAAT TTTAAGACTT CAGCAACTCC
1021 TACTCCGTTA AATCTTGCAT GTCTTAGAGG TGATAATGAG GTAGTACGTG GGTTAGTAGG
1081 TCAACATGGT ATTGACATTA ACCAACGATG GGAAGTGAT AAAAAACACTG TATTGCATTA
1141 TGCAATCAGC AAAGGAGATA GTTITCTTGT GCAAAAGATA TTAGCTCATA CTGGAGTTGA
1201 TGTTAATTGT GAGAATAACC TAGGTCAAAC GCCTTTACAT TTAGCAGTTG AGGGAGGAGA
1261 TCCTAAGATA GTATCTTCTC TTCTTAAAGC TGGTGCAGTA GTTAATCGTC TGGATGATAA

1321 TGGTAGATCT GTACTTCTCT CTGCGATAGT TCCAGGTAGA AAAGAAAAGG GAGTGCTGGG
1381 TATAGTTAAT AAATTGCTGG ATAGAGGTGC AGATATTAAT TTAGATGGAG ACCACAATAT
1441 ACTTTTGTAG CAGTGCTTAA GGGGTGGATA TAATAATGTA TTAGATAAGT TAATACAACA
1501 AGGGGTTGAA GTTAACTGAA ATAGTGAAAT ACGTCCAATG GTTTATGCTG CAATATCTGG
1561 TAATGAGCAT GCTATCAAAT CATTAGCTAA TGCTGGTGGG GATGTTAATG AAGTAGTAAA
1621 TAATCCATCT AGTAGGCATT CAGGAAATCC TTTAATTATG GTTGCAGTAG CAGATGGTAA
1681 TGCAGGICTT CTTAAACCAT TAGTTTCTGA AGGATGTGAT GTTGGTAAAT CTGGAAGA
1741 TGGTAATATA GCGTTACATT ATGCTGTTAG TCATTCCAGT AAAGAGTTTG GTAATAAAGC
1801 TATAAAGATA TTAATTTTAC GTAATAGTGT TGGGACTAAT AGAGATATTC TTAATCATAA
1861 GAATAACGCA GGTGATACAC CTTTACATGA AGCTCTTAAG TCAGGTAATA TTAATCTGT
1921 ACAGAATATC TTAAGTCTG TACATCCAAG ATACGCAAGG GAGATATTA CAGCCAGAGA
1981 CAAAGAAGGG TACACACCAA TGCATTATAC TGTGGAGTA AATAATGTTG ATGTTGGTAG
2041 AAGTATTCTA GAGTCTATGC TCTCTAAAGG TGTGAATAAT CTGGAGAGA TTGTTGGAGC
2101 ACAGGATAGT AATTTTCGAA CACCTCTGCA TGCTGCTATT AAAATATCTG ATTATCGTGC
2161 TGCGGACATG ATAATAGGTA GCTTATCGAA AACAGAATTG TCAAAGTTAT CGCAATTAAC
2221 AGATATTAAC GGGGATACAC CACTACATCT TTCTTGTGAG TCTGGTAATG TCGAGATGAC
2281 ACAATCTTTT CTGGAGGTT TGGATAAAGC TGAATTACCT AAGACATTA AGATAGCAAA
2341 TAAAAATGGA GATACTCTT TACATGATGC TATAAGAAAT GATGATATTA AATCTGCAAA
2401 AATGATGATT AGGAATTGTA ACAAAGAAGA ACTTGCTAAT GTATTAATAAT GTAAAGATAG
2461 TTTTGGTAAAT ACAGTATTGC ATACTATTGC TGACCAAGTT ATTGCGAATC CAGAATCAAA
2521 GAAAGACCTT GATGGTTTGA TGAATTTAGC AGTGAAAAGG CTAAGAATC AAGATCTGAA
2581 AGATCTAGTT AATACGCGAA ATAACCTCTGA CGATACTGTT GCACATTGTG CTCTTTTATC
2641 GGATATGAAA TATGCTCAAA AGATACTTAA ATCATGTAAC CATGATACAT TAGTGAGAGG
2701 AAATAGTAAT AATCAATCTT TATCAGAGTG TATTCGTGAT GATAGTAAAT ATAAAAAGG
2761 TGGAAATTTT GAAGTCTTT TATTTTCAAA ATTAAGAAGA CTTGAGGCAC GAGCTGCCAG
2821 CGTAGTTIAT AGAAGATTAT CTAGTATCAG TAGTGGTAGT GATGTTTCTT CTGTATCAAC
2881 AAATAGCACA GAAGTAAAGT CAGTACCTGA AGTGGCAAGA AGTAGTGGTG CTGTGTCGTT
2941 CAAACATGTC CAAGAACAGC GAGTTGACAC GTCTGGTCTT TCTGATATAG AAAGTTTAGA
3001 GAGATTATCT GATACTAGT TTGGGTCAAA TGATTTTGTG CAGCGAATG CAGATTTAGA
3061 TCAAGAAATA GCAAATATTG TTAGTGGTTT ACCAGAAGTT ACCCAGGTAG CTGTAAGTCA
3121 ACAACAAGCA GCATCTCCTA GTTCAGGTCA AGCTGCTGGT GTGCAACAAA AAGAGATGCA
3181 GAGATAA

5

SEQ ID NO:4 Secuencia proteica parcial del antígeno de 200kDa
ORIGEN

1 NLDVFLVGDG GKNPLHVAE HLPPVILKGV MDHVKNSEF QDLVNDPDYF GNTIAHYAVK
61 NKNADLTLFN MLKASGADLN VRNVVGRAPI HVASSNGKAN AVSGLVSCGI DVNSQDVNGD
121 TPLHIAVEGG SMETVLAVLN QRGADVSVQN NDGVTPLMSA AKYGDIGVIK ALGSAKPNIK
181 GEDTVAKSLN MEDYGFPTL HFVAGGSRD TFRVVRKNYE KCHDLATIRA ALMQDRSGGE
241 LVNLGDFESE NILGSPNAKF LQHIQSANFG FSPAHCIVS SNHNVMKDIL NFGVDSLHLPL
301 SERGYNAMQV AALFGDKEAV KMLAKSAKPS DLNFKTSATP TPLNLACLGR DNEVVRGLVG
361 QHGIDINQRM GSDKNTVLHY AISKGDSFLV QKILAHTGVD VNCENNLGQT PLHLAVEGGD
421 PKIVSSLLKA GAVNRLDDN GRSVLSSAIV PGRKEKGVLG IVNKLDRGA DINLDDGHNI
481 LFDQCLRGGY NNVLDKLIQQ GVEVNRNSEI RPMVYAAISG NEHAIKSLAN AGGDVNEVVN
541 NPSSRRHSGNP LIMVAVADGN AGLLKTIVSE GCDVKGSGKD GNTALHYAVS HSDKEFGNKA
601 IKILISRNSV GTNRDILTQK NNAGDTPLHE ALKSGNINSV QNILSAVHPR YAKEILTARD
661 KEGYTPMHYT VGVNVDVGR SILESMLSKG VNNLGEIVGA QDSNFRTPHL AAIKISDYRA
721 ADMIIGLSLK TELSKLSQLT DINGDTPLHL SCQSGNVEMT QFPLGGLDKR ELPKTLKIAN
781 KNGDTPHLDA IRNDDIKSAK MMIRNCNKEE LANVLKCKDS FGNITVHTIA DQVIANPESK
841 KDLDGLMNLV VKRLKQDLK DLVNTRNNSD DTVAHCALLS DMKYAQKILK SCNHDTLVRG
901 NSNNQSLSEC IRDDSKYKKG GIFSKSLFSK LKKLEAARAS ASYEELSSIS SGSDVSSVST
961 NSTEVS AVPE VARSSGAVSF KHVQETGVD TSGPSDIESLE RLSDTSLGSN DFDQRMADLD
1021 QEIANIVSGL PEVTQVAVSQ QQAASPSGQ AAGVQKEMQ R.

SEQ ID NO:5 Secuencia nucleotídica del fragmento del clon 84 - ATPasa
ORIGEN

1 AATTATGCTG AAACACTCTT ATCATTGGT GAATCTCGAG CAGAAGGACG TGAATCTCCA
61 TCAAGTGCAT TTGTTCAAAC TGGTCAATCA GAAGTACCTC GGAGTGAGGC TGCAGAGCCA
121 TTAATTTCAAT TCCTCATGA TGAAGAAAGT ACTGCATTAG GTTCTCAAGC AACTATGACA
181 GGAGTGTCTA CTCAGGCTAG TCCGTCAGCA GCATATCAGG ATGATAGTGA AATATCACGT
241 ATGAGGTCTA TGGCAGGAAC ATCTGCTCAA GCTGATCAAT CAGCAGTACA TCGTCGGAGT
301 GGTACAGCAT TAGAGCCATT AATGAATTG CCTGATGAAG AAGAAAATGC TGCATTAGAT

361 TTTCAAACAG CTATGACAGG AGTGCCTACT CAGGCTAGTC CGTCAGCAGT ACATCGGAGT
421 GGTGTTGCAT CAGATCCTAC GCTACCTGAT GATGAAAGAA TTGATGTTCC ATCAGTTTCA
481 TCTCAAGTTG TAAGACCTTT TAGTGATGGT GAAGATTATT CAGTATATGA TAAATCAGGT
541 GTAGTAAAGT GTCATGAAAG ACCTGTTTCT TCTAGAGATT CAAGACAATT GGATGCATTT
601 GGTGATCCAT CAGATGATTT ATTGCCGGAG AGTGAATAA TTGTTAGCAG CAGTAAGAAA
661 GCAATATTAG ATAGCCAAA TGAATAGAA TCTCTTATTC AGAGTGGAGA TACTTCTAGA
721 TGTATTAGGG CAATTAATAG TGTCTTACT GCGTCAGTGT TTCAACTGAA GACTTTATCG
781 AATGATATAT CTATTGCTGG ACGTGCCTTT TTAATGGTA ATATTGATT AATAGAGCT
841 TGTATGAATT CTGGCAAGAA ATTAATCCA AATATTACTG ATAATGAAA AAATACTCTA
901 TTACATCAAT TTGTAGATA TTTTGAACGC GATCCGAGAA TGTGCTTGA TGCAGGAATG
961 CGTAATCTGT TTTGAGATT ATGCATGGAT TATGGTTTCG ATATTAATCA TAAAAATAGT
1021 AATGGTAATA CAGTACTTGA TAGATTAAT GATTTAGTAG AAGGGTTAAG TAGTTCGCAA
1081 GTTGATCTTG AAAGTAGTGG TATTGATGAG TTTATGATCT CATTGTTAGC TCATTCTAGA
1141 ATGAGTCATC AAGCAGTAAA GAATATTGCT ACTGCGCAA ATGAGTTTTT TGCACGTGAT
1201 TCTGTTTATA ATATTAGTCG TTTAGTTGAT ACTTCTATAG TTTTGCAGAA TAAATCAGT
1261 GAAGTATTTT ATGAAGTCTG TGGACGTATT TTATCTGAAG AAGCTGGTAA ACATAAGGGT
1321 GTTGCTGAAG CAAATFATT C AAGATTGAAT AAAATATTAA ATGATGAATG TCTTAGAAA
1381 ACTTTAGCTA ATACAGATGC CGATGGAAT AATGTTTTAC AGAGATTGTG TCAAGATATT
1441 GCTTCTGAA AAATCAATGC TCGTGTGAC AGAGTATTAA AACTTTTTGA GACAATATA
1501 TCTAATTTAA AAGACAAAGA TAAAGCATT CTAGAGGATT TATTATTTAA TAATAGAAAC
1561 TCAAGATTTG AAAATGTCAT TGAAGCTATA CCACGTATTC CTGGTGCCGA TGCTCTATT
1621 AAAAACTAG AAGAGTTATT ATTA AAAAAG AAAATAGCAG AGTCTTGTGA TTTAATTCT
1681 ATGTTAGTGA ATTGTGCTGA GTCTGCTAAT GATAATTTAT ATAATTACCT GCGCACTAAT
1741 TATGCACTTA TTGGTATAAA TAACGTAGAT ATAAATGGCA ATTCATCCCT ATGTAAGCT
1801 GTTGTACTG GGTCAACAAG TATTGTTAAA GCAGTATTAT CAACTGGAAC TAATATTAAT
1861 AGGAAAGATA AAAATGGTAA TACACCTTTA CATGCATTGT TAATTTTTAT GATGTCTAAC
1921 CCGAAGTTC TCAAGGAGCA ACATATTTCA CTTGTGAAAT TCTTAGCGTC TCGTGGAGCT
1981 TTAATTAATG TAAAAATAA TATGAATATT TCTCCAATTA TGCTGCAGA ATCTATTGAT
2041 AAGAAAGAGG AACTTGTCTA GAAATTTACA AATCAAAAAG TTAGTATTTT AGAATCTTTA
2101 ATAGCTGGTA GTGAAGAACA TTTAGGGCTT AAATCCAAAT GTATATCTGA GTTAAAGCCT
2161 TATATGAAT TAGGAAAAGG CATGAAGTAC GAAGATATAC ATGCTGATGT AATAGTGGT
2221 GTATTATCTG CTGATATGTG TAATGCTAGA TTGCAGATAG GTAAATTTAT AAATGGTGT
2281 TTTTGTAAAG AAAATGAATT AAAGACAGTA AAATTTAATT TTTCTGATAC AAATAAGGGT
5 2341 TATGTACAAA ATGTTGGTAA AAAAAGAAAT TAT

SEQ ID NO:6 Secuencia proteica del fragmento del clon 84 - ATPasa
ORIGEN

1 NYAETTLTSLFV ESRAEGRESP SFAFVQTGQS EVPRSEAAEP LIQFPHEDES TALGSQATMT
61 GVSTQASPSA AYQDDSEISR MRSMAGTSAQ ADQSAVHRRS GTALEPLIEL PDEEENAALD
121 FQTAMTGVPT QASPSAVHRS GVASDPTLPD DERIDVPSVS SQVVRPFSDFG EDYSVYDKSG
181 VVSGHERPVS SRDSRQLDAF GDPDLDLLEP SEIIVSSSKK AILDSQNEIE SLIQSGDTSR
241 CIRAINSAFS ASVFQKLTLS NDISIAGRAF LNGNIDLIEA CMNSGKKNLP NITDNEKNL
301 LHQFVGYFER DPRMLLDAGM RNLFLRLCMD YGFDINHKN NGNTVLDRLN DLVEGLSSSQ
361 VDLESSGIDE FMISLLAHSR MSDQAVKNIA TAQNEFFARD SVYNISRLVD TSIVLQNKFS
421 EVFVEVCGRI LSEEAGKHG VAEANYSRLN KILNDECLRK TLANTDADGN NVLQRLCQDI
481 ASGKINARDD RVLKLPETII SNLKDCKAL LEDLLFNRRN SRFENCIEAI PRIPGADALF
541 KLEELLK KLAESCFNS MLVNCAESAN DNLYNYLRTN YAVIGINNVD INGNSSLCKA
601 VVTGSQGLVK AVLSTGTIN RKDKNGNTP HALLIFMMSN PELVKEQHIS LVKFLASRGA
661 LLNVKNNMNI SPIMLAESID KKEELAKKFT NQKVSILESL IAGSEHLGL KSKCISELKP
721 YIELGKGMKY EDIHADVIG VLSADMENAR LQIGKLLNGD FCKENELKTV KFNFSDTNKG
781 YVQNVGKKRN Y

SEQ ID NO:7 Secuencia nucleotídica del fragmento del clon 7 - ATPasa
ORIGEN

1 GTAAAAAAT TAAGATTATT ATTA AATTCA ATAAGTGAGT TACCGCAAGA ATTA AAGAT
61 CAAATTTTAA GTACTAGAAG TACTATAGAT AAATTACGAA ATAGAATTAA TGCCTGCATA
121 AAGTCTGACG ATAGAGAAGG TATTGCACAT GCTGTAGAAT CTATGGCTAG TTCTTATTGT
181 GAATTATTAG GACATTGTAG ATTAATTTTT AAGAAATTAT ATGATGAAAA TGCTGATAAA
241 AGTTTGTCTAG AATFATGTAT TAAAGAATAT CAATCTGAT TAAACAAATT ATTGAACAA
301 GGTATTGATA TATGTGCTTC AGAAGTCTCA TCAGAATGTA AGGATTTAGT TTGTAAGATA
361 TGTGAAGATG AATTTGAGAA ATATGACTCT TTATCTAAAG TACAAAGATT CAGGGAATTA
421 TCTGGTGAAA TTGCTGATTT GGATGATAAA TTAACAAGAA GGGCTTCTTT TGTTGAGACT
481 TTTGATTAT TTAGCAGTAG ATTAAGACAT TATAGGGAAA TTTAGGAGA TGTTGATTTA

10

541 AAATTTCCGAG AGAGGATAGT TGAAAAATAT CAAGAGGATT TAAAGGAATT ATTAGAATTA
601 TCTGTTGATC TTCATTTGTT AATAAAATTA CCAGCATTAG AAGATTTACG CGATCATAGA
661 AATTTAGTGC ATAGAGCATG TAATGCTGAA ATTGAAAAAT ATCTAACTTT ATTTGATGAT
721 CAACAATTAC GTACATTATC GCAAGAAGTG AATAATGCTC ATGGTGAATT GATACAGATG
781 TTTTCTAAGT TTAGTATATT TGTGATGGC GTTACTGGTA TTGAACAGAG CACATCTCAA
841 GTAGAGCACC CTCGTCTGTA TATTGCTAAA AGAGATACTA CAACACCCAAA GCAACGTGTT
901 GTGCAAGGTA AAGAIGATAT ACAATCTAGT GATAGTGATA GTGATAGTGA TAGTAAATAC
961 GGTGATGATG ATAGTAAAAA AGCATCAGTT AGTGCACCTG CTGTTGACCA AGTTGTACCT
1021 GTAGCTGATG TTCAACCTGA ACCTCAGCTA GGTGAAGGAT TGGAAACATT AGAGTCTAGT
1081 ATAGCTGAAG GACCTGAGTT GCCTGGTGAT GCATCTACTG CTAAGCAATC TATACCTTTT
1141 GCGATAACAC CATCAAGTCC TGAGACAGTT GATGAAAAAC TTGAAAGTTC TGGTGTAGT
1201 CAAGATGGTA TTACAACACC AGGACAACGT GTTGTGCAAG GTAAAGATGA TATACAATCT
1261 AGTGATAGTG ATAGTGATAG TAAATACGGT GATGATGATA GTAAAAAAGC ATCAGCTAGT
1321 GCACCTGCTG TTGACCAAGT TGTACCTAGT GCTGATGTTT AACCTGAACC TCAGCTAGGT
1381 GAAAAATTGG AAACATTAGA GTCTAGTATA ACTAAAGGAC CTGAGTTGCC TGGTGATGCA
1441 TCTACTGCTA AGCAATCTAT ACCTTTTGGC ATAACACCAT CAAGTCCTGA GACAGTTGAT
1501 GAAAAACTTG AAGTCTCTGG TGTTAGTCAA GATGGTATTA CAACACCAGG ACAACGTGTT
1561 GTGCAAGGTA AAGATGATAT ACAATCTAGT GATAGTGATA GTGATAGTAA ATACGGTGAT
1621 GATGATAGTA AAAAAGCATC AGCTAGTGCA CCTGCTGTTG ACCAAGTTGT ACCTTCTGAC
1681 ACTCGTGACG ATGGAGTATC AGAACCATTA GCATCTCATG TGGATCAAGG ATCTGATGTA
1741 CCTGGTGATG CATCTGTTGA TGGTGTGAT TTAAGATTAG GACGGTTATC TACTGAGCAA
1801 AGTGGATTGT TGCCACGTC TGAACAAAAA GTAAGAGCAT TTATTTTAGA ACAGAGTTTG
1861 TTAGATCAAT TATATATGGA CTATATAGAT TTACACCCTG ATCAGAAAAG TTGTGAAGCT
1921 TATAATTCAG CATTGCATGG ATATAATACA AGATTAGAGT TACAGAAGGA ATATAACAGG
1981 ATTTTTGAAT CACATGAATC AGCATCTCCA AATGAAATTA ATAGTTTTTC ACAAAAAATAT
2041 AGAGCAGCAT TAAGAGATGT TGCGCAGGAT ATGTGTAATC AGGGTCCAAT GTTTTATTCT
2101 TCTAGAGATG CAATGCTATT AAGGGCTAGA GTAGACACAT TGTGTGATAT GTGTCGTTCA
2161 ATACGTAATC TGTATATGGT TGAATTAGAT GCCATAGATA AAGAAGAAAA ATCGTTACAA
2221 TCTGATATGA AATCTGCAAG TTCTAGTGAT AAAAAGTTGA TACAAGAAAA AATAAAATTA
2281 CTT

SEQ ID NO:8 Secuencia proteica del fragmento del clon 7 - ATPasa -
ORIGEN

1 VKKLRLLLNS ISELPQELKD QILSTRSTID KLRNRINACI KSDDREGIAH AVESMASSYC
61 ELLGHCRILF KKLYDENADK SLLELCIKEY QSDLNKLLEQ GIDICASEVS SECKDLVCKV
121 CEDEFEKYDS LSKVQRFREL SGEIADLDDK LTRRASPVET FGLFSSRLRH YREILGDGDL
181 KFRERIVEKY QEDLKELEL SVDLHLLINL PALEDLRDHR NLVHRACNAE IEKYLTFLD
241 QQLRTLSEV NNAHGLIQM FSKFSIFVDG VTGIEQSTSQ VEHPRSDIAK RDTTPKQRV
301 VQKDDIQSS DSDSDSDSKY GDDDSKKASV SAPAVDQVVP VADVQPEPQL GEGLETLESS
361 IAEGPELPGD ASTAKQSIPF AITPSSPETV DEKLESSGVS QDGIITPGQR VVQKDDIQS
421 SDSDSDSKYG DSDSKKASAS APAVDQVVPV ADVQPEPQLG EKLETLESSI TKGPELPGDA
481 STAKQSIPFA ITPSSPETVD EKLESSGVSQ DGITTPGQRV VQKDDIQSS DSDSDSKYGD
541 DSDSKKASASA PAVDQVVPD TRADGVSEPL ASHVDQGSV PGDASVDGVD LRLGRLSTEQ
601 SGLLPRHEQN VRAFILEQSL LDQLYMDYID LHPDQKSCEA YNSALHGYNT RLELQKEYNR
661 IFESHESASP NEINSFSQKY RAALRDVAQD IVNQGPMFYS SRDAMLLRAR VDTLDCMCRS
721 IRNLYMVELD AIDKKEKSLQ SDMKSSASSD KKLIQEKIKL L

5 SEQ ID NO:9: Secuencia nucleotídica del antígeno p16

ORIGEN

1 ATGTTACACG TTCAAATCA TGTTGATCAA CATAAATC ATATAGAACA TGATGATTAC
61 CATTTTACTG GTCCTACTAG TTTTGAAGTT AATCTTCTG AAGAAGAAAA AATGGAGTTA
121 CAAGAAGTAT CTTCTATTGA TAGTGTAGGA TGCGAAGATT GTGATCCAAA TTGTCGTAT
181 CCTTTAGAAAT TAGTAGAATG TCAGCGTATT GAGGAAAGAC CAGTATGCAA TGCAGGTTA
241 GAGAGCTTGA CTGTTGATGC ATATCAATTA GGATTGTGT TAGGTGTTT TTTAAGTGCT
301 ATGAATTACA TATCTTATAG CTATCCTTGT TATTATTATG ATTGTTGTGA TAGAAATTAT
361 TACGACTGTT GTCATAAGAA TGCGTGTTAT TACAACGTGT GTGATTGTGC GTAA

SEQ ID NO:10 Secuencia proteica del antígeno p16

ORIGEN

1 MLHVQNHVDQ HTNHIEHDDY HFTGPTSFEV NLSEEEKMEL QEVSSIDSVG CEDCDPNCRY
61 PLELVEQRI EERPVCNAGL ESLTVDAYQL GLLGGFLSA MNYISYSYPC YYDCCDRNY

121 YDCCHKNACY YNCCDCA

SEQ ID NO:11 Secuencia nucleotídica de la proteína L1 ribosómica
ORIGEN

1 ATGACGATTT TCTTAGAAAAG TGATGATGAT AAGAGTAACT TTAAGAAGAC ATTGGAGAAC
61 GGTACTAAAC ACAAGACAAA TCTAGATAAT ACTTATATATG ACTATCATCA TGAAGATGAT
121 ATGGGAAATA CTGAATATCA TTATGTGAGT TTGGATAGAG TGGATCATGT TAAGATGCCT
181 GAAGAGCCTG TAGGTTATGG TGGAGATACT TTACCTATTG TTCCCTACTAC AGCTGCTAGT
241 GTATCTGGTA GTGATGCAGG CGTTGCTGTA GGTAAATGTTA AAGATTTTGA AGATAATGTT
301 TTTTCATCATA CATCTACTAT AAGAAACGAT GAATTGAAGA TAGATTACG AATACATACT
361 TTAAGGATT TATCTGATAA AAGATTACGT GAAATTGAAA AGGGATTTAA TGATACGGTA
421 ACAAAATTTA AAAATAATTT TGGGTTAGAA CCAAATGATG GAGAAACTAT TTTTGATTTA
481 TACCTTTTTG ATGATAAGGA ACAATATAAT TATTATGGAA AGCTTTATAA CTTAGGAATT
541 AGTGGATCTG GAGGTATGAC TTTCTATGGA AATGCTAATG TTCCATATAA AATTTATGTA
601 CATCAATATG GTGAAATATT GAATTTAAA CATGAATTAA CTCATGCATT AGAAAGTTAT
661 GCATCTGGAC ATAAATTGCA TGGTCTGAC GTAAATAGCA GAATATTTAC GGAAGGATTA
721 GCTGATTATA TCCAAGAAGA TAATAGTTTT ATTATGAGAG GATTAAAGGA TCGAGAGATC
781 ACTTCAGATG TATTGAAAGA TTCTTCTGGT AATGTAGATC ATTTAAGTGG TGTTCAGTGG
841 AATGAAAATC AGAGGTTAAG TTATAGTATA GGACATGCAT TTGTAAGCTT TTTACAAGAG
901 AAATATCCTA AGTTAATTTT GGAATATTTA AACGCATTTA AAGAGGATAA TATTATTCGT
961 GCTAAAAGAAA TAATTAAGTAT GGATAAGTAT CCAGATTTTG AGCCGTGGGT GAAGTCTAAA
1021 GACATTAGTT TATATTTAGA AAAATATGAAT GTATTAAGT TAGGATTAGG TGAGAAAATG
1081 TTTTCTGCTG AAAGTGTCTG CTATTTTGAA GATCAAGGTG TCAATAAAGA ATATTACCAT
1141 GAAAATATTT ATGATATGAG TGGTAAACTA GTAGGTGAAA TGTCACCTGT AGTGCATTAT
1201 GCACAAAAAA ATGTGATTCC TATTTGGAAT ATTGCAAGTC CTGATATGAT AGAGGTGCGA
1261 CCAGAATAATA ACTTTCTGAA ATTTGGTAACT ACTCCATCTG GTAAGTCTGC ATATGTATAT
1321 TGTGATAAGA ATGGGCATGA GTATTTTAACT ACTAAAGATT ACATAGATTC TCGGTTTAA
1381 ATATTGGCAA GATATGATGT TAAGCTTCGT GAAAGTAGTG ATGCTTTGGA TATTAGAGGT
1441 CGTACTCAG ATGCTGCTAA AGTGTTTAGT AAGCTGCCTA ATGCGGATTT GCTGTTGGAT
1501 AAGTTTTTAG AAAAAATAGG TTATAGTAGT TATAAGCAGA TAATAATGAG TAATCCAGAA
1561 CAGCTTAATT CTATTAAAGC TTATGTAGTA AAAGAAGTGT TTGAAAATT TAGGGAATCT
1621 GAGGTCAAAA AGGTGTTGAG TGGTGAGTCT CATCCGAAG TAAGAAATGT ATTAATGGAT
1681 CTTACCTATG TTGATTTAAA GAGTGTTATA GGAGTAAATG GTGCAGATAT TGACAGTATT
1741 ATTTCTAATC CAGATTAAT GTTGCGTACT GCTGTGTTAG GTAAAGGAAA TGCAAGTGGG
1801 ATATCTCTAT AGTGTAGTGA TCAGAAAAGT GGTGAGCTGT CAACTGAAGC AGGTTATTGT
1861 GTTAAAAATC TTGATACTGG TAAAGTGTAT TTTATGTTCC ATAATGTTGT TGAATGATA
1921 GCAAGTGGTT ATGAAGACAG AGCATATATG GTTGTATTAG AAAAAGATGG TAAGTTTACT
1981 ACTGCTCTAG TTAATTAAT ATCAAAAAGCA GCAGATGGAA ATGTGTATG GGATAATCAA
2041 TTTAATCATC CGAATATTA TAACCTGCAC TCAAATTATA AGGAGCTGTT GTTAAATGAT
2101 GCTTCAGTTA AAGATTACTC TCATCTTCCG GATGTGAAAT TTAATAAAGA TGATACAGTA
2161 ATTGTTAAAG GTGAATTATT AGATGATAAA GGTACTGTAA GTGTAGATGA TGATGTACAT
2221 CGTGCAGTTG TTAAGCATGA TGATCAATA CTACATCAGT TTAAGAGTAT GTCTTTTAC
2281 ATTACTGAAC CATCAGCTGA TTCAGGTGAC AATATGGA GTGATTTTTT CATTCTGAT
2341 GAAGGAAAAA ATCTTAGATT TCAACTTCCT AAAGCTATTA CGCATTTGAA ATTGGTTAAT
2401 GTTAATGGAA ATAATAAGTT GGTACCATGT ACTAAAGATG GGAATGAACA CCTGGAAGGT
2461 ATGCCATCTG ATTTAACGGA TGAATATAGA TATATAGATC CTATTTTTGC TCATACATTT
2521 GAGAAACAAA GTTATTCTAA AAATAGTATT AGTGTGGGT TAGTGGACTT CAGTAAATAT
2581 AAAGAAGGAT CTATGTTTAA ATTACAGCAT TATCTGATG ATTATCATAT TCATAAGGAT
2641 GAACAAGGTA ATGTTATTAG GCCTAATAAC AGATCTTACG TTACAAAAGT GGATTTAGTA
2701 TATGATGATA AAGTTATTGG GATGTTGTCT GATAGTATA ATCAATTTCA GGGTGATATT
2761 TTCATTCTG CAAGCCTTAA TTATAGCCAC AATGATTTTC TTTTCATCTAA GTACTTTTAC
2821 AAAGTTAATA TTGAGCCGTT AGAAAATGGA ATATATAGTG GAAAGATATGA TGTAGGAGAT
2881 GGTGACCAA TAGCAGGTCT TAATACTGAT ACAGGTTATA GTGATAAAGC TATTTTTTAC
2941 TTTAAAATG ATAGCCATC TACTGATATG CCGGCTAGT ATGTTACTAC TATTTTACCT
3001 TATATAAATG AGCTTTAA

SEQ ID NO:12 Secuencia proteica de la proteína L1 ribosómica
ORIGEN

5

1 MTIFLESDDD KSNFKKTLEN GTKDKTNLDN TYYDYHHEDD MGNTHEYHYVS LDRVDPVHKMP
61 EEPVGYGGDT LPVPTTAAS VSGSDAGVAV GNVKDFEDNV FHHTSTIRND ELKIDLRIHT
121 LKDLSDKRLR EIEKGFNDTV TKFKNNFGL E PNDGETIFDL YLFDDKEQYN YYGKLYNLGI

181 SSGSGMTFYG NANVPYKIYV HOYGEILNLK HELTHALESY ASGHKLHGS D VNSRIFTEGL
241 ADYIQEDNSF IMRGLKDREI TSDVLKDSG NVDHLSGVAV NENQRLSYSI GHAFVSPFQE
301 KYPKLISEYL NALKEDNIIR AKEIISMDKY PDEFEPWVSKS DISLYLENMN VLKLGLEKEM
361 FSAESASYFE DQGVNKEYYH ENIYDMSGKL VGEMSPVVHY AQKNVIRIWN IASPDMEV R
421 PEYNFLKLV TTPSGKSAYVY CDKNGHEYFN TKDYIDSAFN ILARYDVKLR ESSDALDIRG
481 RYSDAAKVFS KLPNADLLLD KFLEKIGYSS YKQIIMSNE QLNSIKAYVV KEVFENPRES
541 EVKVLVSGES HPEVRNVLMD LTYVDLKS VI GVN GADLDSI ISNPDMVLR T AVLKGNASG
601 ISLYVDDQKV GELSTEAGYV VKNLDTGKVY FMFHNVVGMI ASGYEDRAYM VVLEKDGKFT
661 TALVNIIQKA ADGNVVDNQC FNHPNINNLH SNYKELLND ASVKDYSHLA DVKFNKDDTV
721 IVKGELLDK GTVSVDDDVH RAVVKHDDQI LHQFKMSFY ITPESADSGD NYGSDFFISD
781 EGKNLRFQLP KAITHLKLVN VNGNKLVP C TKDGNEHPEG MPSDLTDEYR YIDPIFAHTF
841 EKQSYSKNSI SVGLVDFSKY KEGSMFKLQH YSDDYHIHKD EQGNVIRPN R RSVYTKVDLV
901 YDDKVI GMLS DSINQFQGD I FISASLNYSH NDFLSSKYFQ KVNIEALENG IYSGRYDVG D
961 GDQIAGLNTD TGYSDKAIFY FKND SASTDM PASDVTITLP YINEL.

SEQ ID NO:13 Secuencia nucleotídica de la proteína secretora VirD4 de tipo IV
ORIGEN

1 ATGGATAGTA TAAGTGCAAA TCACATACGC AATATTTTAT TCCTTGTTTT AGGCGCATTT
61 TTTGGACTGG AATTTTGCTT TTATTTATCA GGTGTATTAT TCATCTTAAT GGTCTGGGGA
121 CCAAATTACC TAGATTTTAA TGCTATAAAT CCCAGTTTGA GTGATTTTCC AGACAGAATT
181 TGGCCAAC TA TTTTGGACTA TGTACAACAT TGGTGAAGA ACCCTTCTGC ATACGATGCA
241 GTTTTATTAC TTAAGCTAAT AACGTCATTA TGTACACCAG TAGGTATTCT AAGCATAGTA
301 TTATGGAACC TTAGAATAT ATTATTCGAT TGGAGGCCAT TTAAGAAGAA AGAATCACTG
361 CATGGAGATT CAAGATGGGC AACAGAAAAA GATATTCGCA AAATAGGATT ACGTAGTAGA
421 AAAGGAATAT TATTAGGGAA AGACAAGAGA GGATATCTCA TTGCAGATGG ATATCAACAT
481 GCATTGTAT TTGCACCAAC TGGATCCGGA AAAGGTGTAG GTTTTGTAAT ACCAAACTTA
541 TTATTCGGG AAGATTCGT AGTAGTACAC GATATAAAAT TAGAGAACTA TGATCTTACA
601 AGTGGGTGGA GAAAAAAG GGGACAAGAA GTTTCGTGT GGAACCCAGC ACAACCTGAC
661 GGTATAAGTC ACTGTTACAA CCCATTAGAT TGGATAAGCT CTAAGCCTGG ACAAAATGGTA
721 GATGATGTAC AAAAAATGC CAATCTAATA ATGCCTGAAC AAGATTTTGT GTATAACGAA
781 GCACGTAGT TATTTGTAGG AGTAGTATTA TACTTACTAG CAGTACCAGA AAAAGTAAAA
841 TCCTTTGGAG AAGTTGTAA AACAATGCGC AGCGATGACG TAGTCTACAA CTTAGCAGTA
901 GTACTAGACA CAATAGGGA AAAGATTCAC CCAGTTGCAT ACATGAATAT AGCTGCATT
961 TTACAAAAG CAGACAAAAG ACGTACAGT GTTGTATCAA CTATGAACTC ATCTTTAGAA
1021 TTATGGGCAA ACCCATTAAT AGATACAGCA ACAGCATCAA GTGATTTTAA TATCAAGAA
1081 TTTAAAAGGA AAAAAGTAAC AGTATATGTT GGATTAACAC CAGATAAATT AACTCGTCTT
1141 AGACCTTTAA TGCAGGTATT TTATCAACAA GCTACAGAAT TTTTATGTAG AACTTTACCA
1201 TCAGATGATG AACCATATGG TGTACTGTTC TTAATGGATG AGTTTCCAAC ATTAGGAAAA
1261 ATGGAGCAAT TTCAAACAGG TATCGCATAT TTCCTGGAT ATAGAGTTAG ACTATTTTTG
1321 ATTATTCAAG ATACTGAACA GCTTAAGGT ATATATGAAG AAGCAGGAAT GAACCTATTC
1381 TTATCAACT CTACTTATAG AATAACTTTT GCTGCAATA ATATAGAAAC TGCAAAATTA
1441 ATATCACAGT TAATAGGAAA TAAAAGTGT AACCAAGAGT CTTTAAACAG ACCTAAATTT
1501 TTAGATTTGA ACCCTGCATC ACGTTCATTA CATATATCAG AAACACAAAG AGCTTTACTA
1561 TTACCTCAAG AAGTAATAAT GTTACCCAGA GATGAGCAAA TACTTTAAT AGAATCTACT
1621 TATCCTATAA AATCAAGAA AATAAATAC TATGAAGACA AAAATTTTAC AAAAAACTA
1681 TTAAGAGTA CCTTGTTC AACCAAGAG CCTTATGATC CCAACAAAAC AAAAAACGCA
1741 ACAAAAGAAA ACGAAGAACC TATGCCAAGT ATGAAAGCG ATCTTCTTAA AAATACATCT
1801 GACAATACTG AAAACAATAT GGAAGATGTT GCAATGTACA GCAGCATAGA AGAAGATTAT
1861 GACGATGATG ATGATGATTT TAATTTTGA GACTTAGATG AATATATGGA TGAAGAAGAA
1921 GATTATGATG ATGAAGAATA TGATGATATA GATTATGATG ATAATAACAA TAGTAATGAG
1981 GAGTATGAAG AAGATAATCC AGAAGAAGAT GACAATAGCA ATAATCTAGA CGATGAGGAA
2041 GAGGAAGAAG ATAATATTAT AGATTATGAA GATGAAGAAG AATATGATGA TAACATAGAC
2101 TACAAAGATG ATGACAATAA CTACAACAAA GATACCACTG ACGATCAAGA CTCAAAAAA
2161 CATAATGAAT AG

5 SEQ ID NO:14 Secuencia proteica de la proteína secretora VirD4 de tipo IV
ORIGEN

1 MDSISANHIR NILFLVLGAF FGLEFCFYLS GVLFILMVWG PNYLDFNAIN PSLSDFPDRI
61 WPTIFDYVQH WKNPSAYDA VLLKLITSL CTPVGILSIV LWNLRNIFD WRPFKKESL
121 HGDSRWATEK DIRKIGLRSR KGILGKDKR GYLIADGYQH ALLFAPTGS KGVGFV PNL
181 LFWEDSVVH DIKLENYDLT SGWRKRGQE VFVWNPAPD GISHCYNPLD WISSKPGQMV

241 DDVQKIANLI MPEQDFWYNE ARSLFVGVVL YLLAVPEKVK SFGEVVRTMR SDDVVYNLAV
301 VLDTIGKIH PVAYMNI AAF LQKADKERSG VVSTMNSSE LWANPLIDTA TASSDFNIQE
361 FKRKKVTYVY GLTPDNLTRL RPLMQVFPYQQ ATEFLCRTLP SDDEPYGVLF LMDEFPTL GK
421 MEQFQTGIAY FRGYRVLFL IIQDTEQLKG IYEEAGMNSF LSNSTYRITF AANNIETANL
481 ISQLIGNKTV NQESLNRPKF LDLNPASRSL HISETQRALL LPQEVIMLPR DEQILLIEST
541 YPIKSKKIKY YEDKNFTKKL LKSTFVPTQE PYDPNKTKTA TKENEEMPMS IESDLPKNTS
601 DNTEENMEDG AMYSSIEEDY DDDDDDFNFE DLUEYMD EEE DYDDEEYDDI DYDDNNNSNE
661 EYEEDNPEED DNSNNLDDEE EEDNIIDYE DEBEYDDNID YKDDNNYNK DTDDQDSKK
721 HNE .

SEQ ID NO:15

MDIDNNVTTSSSTQDKSGNLMEVIMRILNFGNNSD
 EKVSNE~~DTKVLV~~ESLQPAVNDNVGNPSSSEVGKEEN
 APEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGGKVSSETSKEE
 STPEVKAEDLQPAVDGSEI~~HSSSEVGEKVS~~KT~~SKE~~
 ESTPEVKAEDLQPAVDDSEHSSSEVGEKVSSETS~~K~~
 EENTPEVKAEDLQPAVDGSEI~~HSSSEVGEKVS~~KT~~S~~
 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSEHSSSEVGEKVS~~SET~~
 SKEENTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGEKVS~~K~~
 TSKEESTPEVKAEDLQPAVDDSEHSSSEVGEKVS
 ETSKEENTPEVRAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGEK~~V~~
 SETSKEESTPEVKAEDLQPAVDSSEI~~HSSSEVGGK~~
 VSETSKEESTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGE
 KVSETSKEENTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGE
 EKVSETSKEENTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEV
 GEKVSSETSKEESTPEVKAEDLQPAVDDSEHSSSE
 VGEKVSSETSKEESTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSS
 EVGEKVSSETSKEESTPEVKA~~EVQPVADGNP~~VPLNP
 MPSIDNIDTNIIFHYHKDCKKGS~~AVGTDEMCCPV~~S
 ELMAGEHVHMYGIYVYRVQSVKDL~~SGVFNIDHSTC~~
 DCNLDVYFVGYNSFTNKETVDLI

SEQ ID NO:16

KEENAPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGGKVSSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDGSEI~~HSSSEVGEKVS~~KT~~S~~
 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSEHSSSEVGEKVSSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDGSEI~~HSSSEVGEKVS~~KT~~S~~
 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSEHSSSEVGEKVSSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGEKVSSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSEHSSSEVGEKVSSETS
 KEENTPEVRAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGEKVSSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDSSEI~~HSSSEVGGKVS~~SETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGEKVSSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGEKVSSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGEKVSSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSEHSSSEVGEKVSSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGEKVSSETS
 KEESTPEVKA~~E~~

- 5 SEQ ID NO:18 *E. canis* P140-1 (72,89)
 CPEVKAEDLQPAVDGSEVH

SEQ ID NO:19 *E. canis* P140-3 (64,89)
 CEVGKEENAPEVKAEDLQPAVDGSEVH

- 10 SEQ ID NO:20 *E. canis*
 CKEESTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGEKVSSETS

SEQ ID NO:21
 XPEVKAEDLQPAVDGSEVHX, wherein X = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 aminoácidos.

SEQ ID NO:22 *E. canis*
 CKEESTPEVKAEDLQPAVDGSEVHSSSEVGGKVSSETS; donde X = K o E.

15

Listado de secuencias

<110> Krah, Eugene R
 O'Connor, Thomas P.
 Beall, Melissa J

- 20 <120> DIVA (Diferenciación entre animales infectados y animales vacunados) con *Ehrlichia canis*

<130> 04-947C

<150> 60/668205

<151> 2005-04-04

<150> 11/397,222

- 25 <151> 2006-04-04

ES 2 581 880 T3

<160> 22

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2067

5 <212> DNA

<213> Ehrlichia canis

<400> 1

```

atggatattg ataacaataa tgtgactaca tcaagtacgc aagataaaag tgggaattta      60
atggaagtga ttatgcgtat attaaat ttt ggtaataatt cagatgagaa agtaagcaat      120
gaagacacta aagttcttgt agagagttta caacctgctg tgaatgacaa tntaggaat      180
ccatcaagtg aagttggtaa agaagaaaat gctcctgaag ttaaagcggg agatttgcaa      240
cctgctgtag atggtagtgt agaacattca tcaagtgaag ttgggaaaaa agtatctgaa      300
actagtaaag aggaaagtac tcttgaagtt aaagcagaag atttgcaacc tgctgtagat      360
ggtagtatag aacattcatc aagtgaagtt ggagaaaaag tatctaaaac tagtaaagag      420
gaaagtactc ctgaagttaa agcagaagat ttgcaacctg ctgtagatga tagtgtggaa      480
cattcatcaa gtgaagttgg agaaaaagta tctgaaacta gtaaagagga aaatactcct      540
gaagttaaag cagaagattt gcaacctgct gtagatggta gtatagaaca ttcattcaagt      600
gaagttggag aaaaagtatc taaaactagt aaagaggaaa gtactcctga agttaaagca      660
gaagatttgc aacctgctgt agatgatagt gtggaacatt catcaagtga agttggagaa      720
aaagtatctg aaactagtaa agaggaaaat actcctgaag ttaaagcaga agatttgcaa      780
cctgctgtag atggtagtgt ggaacattca tcaagtgaag ttggagaaaa agtatctaaa      840
actagtaaag aggaaagtac tcttgaagtt aaagcagaag atttgcaacc tgctgtagat      900

```

ES 2 581 880 T3

gatagtgagg aacattcatc aagtgaagtt ggagaaaaag tatctgaaac tagtaaagag 960
 gaaaatactc ctgaagttag agcagaagat ttgcaacctg ctgtagatgg tagtgtagaa 1020
 cattcatcaa gtgaagttgg agaaaaagta tctgaaacta gtaaagagga aagtactcct 1080
 gaagttaaag cagaagattt gcaacctgct gtagatagta gtatagaaca ttcattcaagt 1140
 gaagttggga aaaaagtatc tgaaactagt aaagaggaaa gtactcctga agttaaagca 1200
 gaagatttgc aacctgctgt agatggtagt gtagaacatt catcaagtga agttggagaa 1260
 aaagtatctg aaactagtaa agaggaaaat actcctgaag ttaaagcaga agatttgcaa 1320
 cctgctgtag atggtagtgt agaaccattca tcaagtgaag ttggagaaaa agtatctgaa 1380
 actagtaaag aggaaaatac tctggaagt aaagcggag atttgcaacc tgctgtagat 1440
 ggtagtgtag aacattcatc aagtgaagtt ggagaaaaag tatctgaaac tagtaaagaa 1500
 gaaagtactc ctgaagttaa agcagaagat ttgcaacctg ctgtagatga tagtgtagaa 1560
 cattcatcaa gtgaagttgg agaaaaagta tctgaaacta gtaaagaaga aagtactcct 1620
 gaagttaaag cggaagattt gcaacctgct gtagatggta gtgtggaaca ttcattcaagt 1680
 gaagttggag aaaaagtatc tgagactagt aaagaggaaa gtactcctga agttaaagcg 1740
 gaagtacagc ctgttcgaga tggtaacct gttcctttaa atcctatgcc ttcaattgat 1800
 aatattgata ctaatataat attccattac cataaagact gtaaaaaagg ttcagctgta 1860
 ggaacagatg aatgtgttg tctgtatca gaattaatgg ctggggaaca tgttcatatg 1920
 tatggaattt atgtctatag agttcaatca gtaaaggatt taagtgggtg atttaatata 1980
 gatcattcta catgtgattg taatttagat gtttatattg taggatacaa ttcttttact 2040
 aacaaagaaa cagttgattt aatataa 2067

<210> 2

<211> 688

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia canis

<400> 2

Met Asp Ile Asp Asn Asn Asn Val Thr Thr Ser Ser Thr Gln Asp Lys
 1 5 10 15

Ser Gly Asn Leu Met Glu Val Ile Met Arg Ile Leu Asn Phe Gly Asn
 20 25 30

Asn Ser Asp Glu Lys Val Ser Asn Glu Asp Thr Lys Val Leu Val Glu

ES 2 581 880 T3

	35					40									45				
Ser	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asn	Asp	Asn	Val	Gly	Asn	Pro	Ser	Ser	Glu				
	50					55					60								
Val	Gly	Lys	Glu	Glu	Asn	Ala	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln				
	65				70					75					80				
Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Lys				
				85					90					95					
Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala				
			100					105						110					
Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Ile	Glu	His	Ser	Ser	Ser				
		115					120					125							
Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Lys	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro				
	130						135					140							
Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Val	Glu				
	145				150					155					160				
His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu				
				165					170					175					
Glu	Asn	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp				
			180					185						190					
Gly	Ser	Ile	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Lys				
		195					200					205							
Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln				
	210					215					220								
Pro	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu				
	225				230					235					240				
Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Asn	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala				
				245					250					255					
Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser				

ES 2 581 880 T3

	260		265		270														
Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Lys	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro				
	275						280					285							
Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Asp	Ser	Val	Glu				
	290					295					300								
His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu				
305					310					315					320				
Glu	Asn	Thr	Pro	Glu	Val	Arg	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp				
				325					330						335				
Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu				
			340					345						350					
Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln				
		355					360						365						
Pro	Ala	Val	Asp	Ser	Ser	Ile	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Lys				
	370					375						380							
Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala				
385					390					395					400				
Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser				
				405					410						415				
Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Asn	Thr	Pro				
			420					425						430					
Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu				
		435					440					445							
His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu				
	450					455					460								
Glu	Asn	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp				
465					470					475					480				
Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu				
				485						490					495				

ES 2 581 880 T3

Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln
500 505 510

Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu
515 520 525

Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala
530 535 540

Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser
545 550 555 560 565

Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro
565 570 575

Glu Val Lys Ala Glu Val Gln Pro Val Ala Asp Gly Asn Pro Val Pro
580 585 590

Leu Asn Pro Met Pro Ser Ile Asp Asn Ile Asp Thr Asn Ile Ile Phe
595 600 605

His Tyr His Lys Asp Cys Lys Lys Gly Ser Ala Val Gly Thr Asp Glu
610 615 620

Met Cys Cys Pro Val Ser Glu Leu Met Ala Gly Glu His Val His Met
625 630 635 640

Tyr Gly Ile Tyr Val Tyr Arg Val Gln Ser Val Lys Asp Leu Ser Gly
645 650 655

Val Phe Asn Ile Asp His Ser Thr Cys Asp Cys Asn Leu Asp Val Tyr
660 665 670

Phe Val Gly Tyr Asn Ser Phe Thr Asn Lys Glu Thr Val Asp Leu Ile
675 680 685

<210> 3

<211> 3186

<212> DNA

5 <213> Ehrlichia canis

<400> 3

ES 2 581 880 T3

aatttagatt ttggacttgt agatggagat ggtaaaaaatc ctttacatca tgctgttgaa 60
catttgccac ctgttatact taagggcgta atggaccatg taaaaaatag tagtgagttt 120
caagatttag taaatgatcc tgattatfff ggaataacta tagctatta tgcagttaag 180
aataaaaatg ctgatttaac atgttttaac atgctgaaag cttcaggagc tgatttaaat 240
gttaggaatg tagttggctg agctccaata catgttgctt cttctaattg taaggctaatt 300
gcagtttctg gacttgatc atgtgggtatt gacgttaatt ctcaagatgt gaatggagat 360
acaccacttc atattgctgt tgaaggcggg agtatggaga cggatattagc agtggttaaat 420
cagagagggtg ctgatgtag tgtccagaat aacgatggag ttacacctat gcttagtgct 480
gctaaatatg gagatatagg tgtaataaaa gcttttaggt cagctaaacc aatatataaa 540
ggggaagaca ctgttgctaa atcattgctg atggaggatt acaaagggtt tacacccttg 600
cattttgtag ctgggtgggg tagcagagat acattccgtg tcgtaagaaa aaattatgaa 660
aaatgtcatg acttagctac tattagggca gctttaatgc aagatagaag tgggtggtag 720
cttgtaaatt taggggattt tgaagtgaa aatatattgg gttcgcgaaa tgcaaaattc 780
ttgcagcata ttcaatcagc aaatfffgtt ttttctccag cgcattgtgc tatagtatcg 840
tctaatacaca atgtaatgaa agatatctta aatfffgtt gggattcgtt acacctacca 900
agtgagcgtg ggtataatgc aatgcagggt gctgctttgt ttggtgacaa agaagcagtg 960
aaaatgcttg ctaaaagtgc taagccaagt gatcttaatt ttaagacttc agcaactcct 1020
actccgttaa atcttgcatg tottagaggt gataatgagg tagtacgtgg gttagtaggt 1080
caacatggta ttgacattaa ccaacgatg ggaagtgata aaaacactgt attgcattat 1140
gcaatcagca aaggagatag ttttcttggt caaaagatat tagctcatalc tggagtggat 1200
gttaattgtg agaataacct aggtcaaacg cctttacatt tagcagttga gggaggagat 1260
cctaagatag tatcttctct tottaaagct ggtgcagtag ttaatcgtct ggatgataat 1320
ggtagatctg tactttcttc tgcgatagtt ccaggtagaa aagaaaaggg agtgctgggt 1380
atagttaata aatgctgga tagagggtca gatattaatt tagatggaga ccacaatata 1440
cttttgatc agtgtctaag ggggtgatat aataatgtat tagataagtt aatacaaaa 1500
ggggttgaag ttaatcgaag tagtgaaata cgtccaatgg tttatgctgc aatatctggg 1560
aatgagcatg ctatcaaatc attagctaatt gctgggtggg atgttaatga agtagtaaat 1620
aatccatcta gtaggcattc aggaaatcct ttaattatgg ttgcagtagc agatggtaat 1680
gcaggtcttc ttaaaacatt agtttctgaa ggatgtgatg ttggtaaatc tggaaaagat 1740

ES 2 581 880 T3

ggtaatacag egttacatta tgctgtagt cattcagata aagagtttgg taataaagct 1800
 ataaagatat taatttcacg taatagtgtt gggactaata gagatattct tactcaaaag 1860
 aataacgcag gtgatacacc tttacatgaa gctcttaagt caggtaatat taattctgta 1920
 cagaatatct taagtctgtt acatccaaga tacgcaaagg agatattaac agccagagac 1980
 aaagaagggg acacaccaat gcattatact gttggagtaa ataatggtga tgttggtaga 2040
 agtattctag agtctatgct ctctaaaggt gtgaataatc ttggagagat tgttggagca 2100
 caggatagta attttogaac acctctgcat gctgctatta aaatatctga ttatcgtgct 2160
 gcggacatga taataggtag cttatcgaaa acagaattgt caaagttatc gcaattaaca 2220
 gatattaacg gggatacacc actacatctt tcttgtcagt ctggtaatgt cgagatgaca 2280
 caattctttc ttggaggttt ggataaacgt gaattaccta agacattaaa gatagcaaat 2340
 aaaaatggag atactccttt acatgatgct ataagaaatg atgatattaa atctgcaaaa 2400
 atgatgatta ggaattgtaa caaagaagaa cttgctaattg tattaaaatg taaagatagt 2460
 tttggtaata cagtattgca tactattgct gaccaagtta ttgcgaatcc agaatcaaaag 2520
 aaagacctg atggtttgat gaatttagca gtgaaaaggc taaagaatca agatctgaaa 2580
 gatctagtta atacgcgaaa taactctgac gatactgttg cacattgtgc tcttttatcg 2640
 gatatgaaat atgctcaaaa gatacttaaa tcatgtaacc atgatacatt agtgagagga 2700
 aatagtaata atcaatcttt atcagagtgt attcgtgatg atagtaaata taaaaaaggt 2760
 ggaattttta gtaagtcttt attttcaaaa ttaaagaaac ttgaggcacg agctgccagc 2820
 gctagttatg aagaattatc tagtatcagt agtggttagtg atgtttcttc tgtatcaaca 2880
 aatagcacag aagtaagtgc agtacctgaa gtggcaagaa gtagtggtgc tgtgtcgttc 2940
 aaacatgtgc aagaaacagg agttgacacg tctggtcctt ctgatataga aagtttagag 3000
 agattatctg atactagtct tgggtcaaat gattttgatc agcgaatggc agatttagat 3060
 caagaaatag caaatattgt tagtggttta ccagaagta cccaggtagc tgtaagtcaa 3120
 caacaagcag catctcctag ttcagggtcaa gctgctggtg tgcaacaaaa agagatgcag 3180
 agataa 3186

<210> 4
 <211> 1061
 <212> PRT

5 <213> Ehrlichia canis

<400> 4

ES 2 581 880 T3

Asn Leu Asp Phe Gly Leu Val Asp Gly Asp Gly Lys Asn Pro Leu His
 1 5 10 15
 His Ala Val Glu His Leu Pro Pro Val Ile Leu Lys Gly Val Met Asp
 20 25 30
 His Val Lys Asn Ser Ser Glu Phe Gln Asp Leu Val Asn Asp Pro Asp
 35 40 45
 Tyr Phe Gly Asn Thr Ile Ala His Tyr Ala Val Lys Asn Lys Asn Ala
 50 55 60
 Asp Leu Thr Leu Phe Asn Met Leu Lys Ala Ser Gly Ala Asp Leu Asn
 65 70 75 80
 Val Arg Asn Val Val Gly Arg Ala Pro Ile His Val Ala Ser Ser Asn
 85 90 95
 Gly Lys Ala Asn Ala Val Ser Gly Leu Val Ser Cys Gly Ile Asp Val
 100 105 110
 Asn Ser Gln Asp Val Asn Gly Asp Thr Pro Leu His Ile Ala Val Glu
 115 120 125
 Gly Gly Ser Met Glu Thr Val Leu Ala Val Leu Asn Gln Arg Gly Ala
 130 135 140
 Asp Val Ser Val Gln Asn Asn Asp Gly Val Thr Pro Met Leu Ser Ala
 145 150 155 160
 Ala Lys Tyr Gly Asp Ile Gly Val Ile Lys Ala Leu Gly Ser Ala Lys
 165 170 175
 Pro Asn Ile Lys Gly Glu Asp Thr Val Ala Lys Ser Leu Leu Met Glu
 180 185 190
 Asp Tyr Lys Gly Phe Thr Pro Leu His Phe Val Ala Gly Gly Gly Ser
 195 200 205
 Arg Asp Thr Phe Arg Val Val Arg Lys Asn Tyr Glu Lys Cys His Asp
 210 215 220

ES 2 581 880 T3

Leu Ala Thr Ile Arg Ala Ala Leu Met Gln Asp Arg Ser Gly Gly Glu
 225 230 235 240
 Leu Val Asn Leu Gly Asp Phe Glu Ser Glu Asn Ile Leu Gly Ser Pro
 245 250 255
 Asn Ala Lys Phe Leu Gln His Ile Gln Ser Ala Asn Phe Gly Phe Ser
 260 265 270
 Pro Ala His Cys Ala Ile Val Ser Ser Asn His Asn Val Met Lys Asp
 275 280 285
 Ile Leu Asn Phe Val Gly Asp Ser Leu His Leu Pro Ser Glu Arg Gly
 290 295 300
 Tyr Asn Ala Met Gln Val Ala Ala Leu Phe Gly Asp Lys Glu Ala Val
 305 310 315 320
 Lys Met Leu Ala Lys Ser Ala Lys Pro Ser Asp Leu Asn Phe Lys Thr
 325 330 335
 Ser Ala Thr Pro Thr Pro Leu Asn Leu Ala Cys Leu Arg Gly Asp Asn
 340 345 350
 Glu Val Val Arg Gly Leu Val Gly Gln His Gly Ile Asp Ile Asn Gln
 355 360 365
 Arg Met Gly Ser Asp Lys Asn Thr Val Leu His Tyr Ala Ile Ser Lys
 370 375 380
 Gly Asp Ser Phe Leu Val Gln Lys Ile Leu Ala His Thr Gly Val Asp
 385 390 395 400
 Val Asn Cys Glu Asn Asn Leu Gly Gln Thr Pro Leu His Leu Ala Val
 405 410 415
 Glu Gly Gly Asp Pro Lys Ile Val Ser Ser Leu Leu Lys Ala Gly Ala
 420 425 430
 Val Val Asn Arg Leu Asp Asp Asn Gly Arg Ser Val Leu Ser Ser Ala
 435 440 445

ES 2 581 880 T3

Ile Val Pro Gly Arg Lys Glu Lys Gly Val Leu Gly Ile Val Asn Lys
450 455 460

Leu Leu Asp Arg Gly Ala Asp Ile Asn Leu Asp Gly Asp His Asn Ile
465 470 475 480

Leu Phe Asp Gln Cys Leu Arg Gly Gly Tyr Asn Asn Val Leu Asp Lys
485 490 495

Leu Ile Gln Gln Gly Val Glu Val Asn Arg Asn Ser Glu Ile Arg Pro
500 505 510

Met Val Tyr Ala Ala Ile Ser Gly Asn Glu His Ala Ile Lys Ser Leu
515 520 525

Ala Asn Ala Gly Gly Asp Val Asn Glu Val Val Asn Asn Pro Ser Ser
530 535 540

Arg His Ser Gly Asn Pro Leu Ile Met Val Ala Val Ala Asp Gly Asn
545 550 555 560

Ala Gly Leu Leu Lys Thr Leu Val Ser Glu Gly Cys Asp Val Gly Lys
565 570 575

Ser Gly Lys Asp Gly Asn Thr Ala Leu His Tyr Ala Val Ser His Ser
580 585 590

Asp Lys Glu Phe Gly Asn Lys Ala Ile Lys Ile Leu Ile Ser Arg Asn
595 600 605

Ser Val Gly Thr Asn Arg Asp Ile Leu Thr Gln Lys Asn Asn Ala Gly
610 615 620

Asp Thr Pro Leu His Glu Ala Leu Lys Ser Gly Asn Ile Asn Ser Val
625 630 635 640

Gln Asn Ile Leu Ser Ala Val His Pro Arg Tyr Ala Lys Glu Ile Leu
645 650 655

Thr Ala Arg Asp Lys Glu Gly Tyr Thr Pro Met His Tyr Thr Val Gly
660 665 670

ES 2 581 880 T3

Val Asn Asn Val Asp Val Gly Arg Ser Ile Leu Glu Ser Met Leu Ser
675 680 685

Lys Gly Val Asn Asn Leu Gly Glu Ile Val Gly Ala Gln Asp Ser Asn
690 695 700

Phe Arg Thr Pro Leu His Ala Ala Ile Lys Ile Ser Asp Tyr Arg Ala
705 710 715 720

Ala Asp Met Ile Ile Gly Ser Leu Ser Lys Thr Glu Leu Ser Lys Leu
725 730 735

Ser Gln Leu Thr Asp Ile Asn Gly Asp Thr Pro Leu His Leu Ser Cys
740 745 750

Gln Ser Gly Asn Val Glu Met Thr Gln Phe Phe Leu Gly Gly Leu Asp
755 760 765

Lys Arg Glu Leu Pro Lys Thr Leu Lys Ile Ala Asn Lys Asn Gly Asp
770 775 780

Thr Pro Leu His Asp Ala Ile Arg Asn Asp Asp Ile Lys Ser Ala Lys
785 790 795 800

Met Met Ile Arg Asn Cys Asn Lys Glu Glu Leu Ala Asn Val Leu Lys
805 810 815

Cys Lys Asp Ser Phe Gly Asn Thr Val Leu His Thr Ile Ala Asp Gln
820 825 830

Val Ile Ala Asn Pro Glu Ser Lys Lys Asp Leu Asp Gly Leu Met Asn
835 840 845

Leu Ala Val Lys Arg Leu Lys Asn Gln Asp Leu Lys Asp Leu Val Asn
850 855 860

Thr Arg Asn Asn Ser Asp Asp Thr Val Ala His Cys Ala Leu Leu Ser
865 870 875 880

Asp Met Lys Tyr Ala Gln Lys Ile Leu Lys Ser Cys Asn His Asp Thr
885 890 895

ES 2 581 880 T3

Leu Val Arg Gly Asn Ser Asn Asn Gln Ser Leu Ser Glu Cys Ile Arg
 900 905 910

Asp Asp Ser Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Ile Phe Ser Lys Ser Leu Phe
 915 920 925

Ser Lys Leu Lys Lys Leu Glu Ala Arg Ala Ala Ser Ala Ser Tyr Glu
 930 935 940

Glu Leu Ser Ser Ile Ser Ser Gly Ser Asp Val Ser Ser Val Ser Thr
 945 950 955 960

Asn Ser Thr Glu Val Ser Ala Val Pro Glu Val Ala Arg Ser Ser Gly
 965 970 975

Ala Val Ser Phe Lys His Val Gln Glu Thr Gly Val Asp Thr Ser Gly
 980 985 990

Pro Ser Asp Ile Glu Ser Leu Glu Arg Leu Ser Asp Thr Ser Leu Gly
 995 1000 1005

Ser Asn Asp Phe Asp Gln Arg Met Ala Asp Leu Asp Gln Glu Ile
 1010 1015 1020

Ala Asn Ile Val Ser Gly Leu Pro Glu Val Thr Gln Val Ala Val
 1025 1030 1035

Ser Gln Gln Gln Ala Ala Ser Pro Ser Ser Gly Gln Ala Ala Gly
 1040 1045 1050

Val Gln Gln Lys Glu Met Gln Arg
 1055 1060

<210> 5

<211> 2373

<212> DNA

5 <213> Ehrlichia canis

<400> 5

aattatgctg aaactacttt atcatttggt gaatctcgag cagaaggacg tgaatctcca 60

tcaagtgcatt ttgttcaaac tgggtcaatca gaagtacctc ggagtgaggc tgcagagcca 120

ttaattcaat ttctcatga tgaagaaagt actgcattag gttctcaagc aactatgaca 180

ES 2 581 880 T3

ggagtgtcta ctcaggctag tccgtcagca gcatatcagg atgatagtga aatatcacgt 240
 atgaggctcta tggcaggaac atctgctcaa gctgatcaat cagcagtaca tcgtcggagt 300
 ggtacagcat tagagccatt aattgaattg cctgatgaag aagaaaatgc tgcattagat 360
 tttcaaacag ctatgacagg agtgcctact caggctagtc cgtcagcagt acatcggagt 420
 ggtgttgcat cagatocctac gctacctgat gatgaaagaa ttgatgttcc atcagtttca 480
 tctcaagttg taagaccttt tagtgatggt gaagattatt cagtatatga taaatcaggt 540
 gtagtaagtg gtcattgaaag acctgtttct tctagagatt caagacaatt ggatgcattt 600
 ggtgatccat cagatgattt attgccggag agtgaaatta ttgttagcag cagtaagaaa 660
 gcaatattag atagccaaaa tgaatatagaa tctcttattc agagtggaga tacttctaga 720
 tgtattaggg caattaatag tgctcctagt gcgtcagtggt ttcaactgaa gactttatcg 780
 aatgatatat ctattgctg agctgctttt ttaaatggta atattgattt aatagaagct 840
 tgtatgaatt ctggcaagaa attaaatcca aatattactg ataataaaaa aaatactcta 900
 ttacatcaat ttgtaggata ttttgaacgc gatccgagaa tgttgcttga tgcaggaatg 960
 cgtaatctgt ttttgagatt atgcatggat tatggtttcg atattaatca taaaaatagt 1020
 aatggtaata cagtaactga tagattaat gatttagtag aagggttaag tagttcgcaa 1080
 gttgatcttg aaagttagtg tattgatgag tttatgatct cattgttagc tcattctaga 1140
 atgagtgatc aagcagtaaa gaatattgct actgcgcaaa atgagttttt tgcacgtgat 1200
 tctgtttata atattagtcg tttagttgat acttctatag ttttgcagaa taaattcagt 1260
 gaagtatttt atgaagtctg tggacgtatt ttatctgaag aagctggtaa acataaggggt 1320
 gttgctgaag caaattattc aagattgaat aaaataata atgatgaatg tcttagaaaag 1380
 actttagcta atacagatgc cgatggaaat aatgttttac agagatttg tcaagatatt 1440
 gcttctggaa aatcaatgc tcgtgatgac agagtattaa aactttttga gacaattata 1500
 tctaatttaa aagacaaaga taaagcatta ctagaggatt tattatttaa taatagaaac 1560
 tcaagatttg aaaattgcat tgaagctata ccacgtattc ctggtgccga tgctctattt 1620
 aaaaaactag aagagttatt attaaaaag aaaatagcag agtcttgta ttttaattct 1680
 atgttagtga attgtgctga gtctgcta at gataatttat ataattacct gcgcactaat 1740
 tatgcagtta ttggtataaa taacgtagat ataaatggca attcatccct atgtaaagct 1800
 gttgttactg ggtcacaagg tattgttaaa gcagtattat caactggaac taatattaat 1860
 aggaaagata aaaatggtaa tacacctta catgcattgt taatttttat gatgtctaac 1920

ES 2 581 880 T3

cctgaacttg tcaaggagca acatatttca cttgtgaaat tcttagcgtc tcgtggagct 1980
 ttacttaatg taaaaaataa tatgaatatt tctccaatta tgcttgacaga atctattgat 2040
 aagaaagagg aacttgctaa gaaatttaca aatcaaaaag ttagtatttt agaatcttta 2100
 atagctggta gtgaagaaca tttagggctt aaatcccaat gtatatctga gttaaagcct 2160
 tatatagaat taggaaaagg catgaagtac gaagatatac atgctgatgt aataggtggt 2220
 gtattatctg ctgatatgtg taatgctaga ttgcagatag gtaaattatt aaatggatgt 2280
 ttttgtaaag aaaatgaatt aaagacagta aaatttaatt tttctgatac aaataagggt 2340
 tatgtacaaa atggttgtaa aaaaagaaat tat 2373

<210> 6

<211> 791

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia canis

<400> 6

Asn Tyr Ala Glu Thr Thr Leu Ser Phe Gly Glu Ser Arg Ala Glu Gly
 1 5 10 15

Arg Glu Ser Pro Ser Ser Ala Phe Val Gln Thr Gly Gln Ser Glu Val
 20 25 30

Pro Arg Ser Glu Ala Ala Glu Pro Leu Ile Gln Phe Pro His Asp Glu
 35 40 45

Glu Ser Thr Ala Leu Gly Ser Gln Ala Thr Met Thr Gly Val Ser Thr
 50 55 60

Gln Ala Ser Pro Ser Ala Ala Tyr Gln Asp Asp Ser Glu Ile Ser Arg
 65 70 75 80

Met Arg Ser Met Ala Gly Thr Ser Ala Gln Ala Asp Gln Ser Ala Val
 85 90 95

His Arg Arg Ser Gly Thr Ala Leu Glu Pro Leu Ile Glu Leu Pro Asp
 100 105 110

Glu Glu Glu Asn Ala Ala Leu Asp Phe Gln Thr Ala Met Thr Gly Val
 115 120 125

ES 2 581 880 T3

Pro Thr Gln Ala Ser Pro Ser Ala Val His Arg Ser Gly Val Ala Ser
 130 135 140
 Asp Pro Thr Leu Pro Asp Asp Glu Arg Ile Asp Val Pro Ser Val Ser
 145 150 155 160
 Ser Gln Val Val Arg Pro Phe Ser Asp Gly Glu Asp Tyr Ser Val Tyr
 165 170 175
 Asp Lys Ser Gly Val Val Ser Gly His Glu Arg Pro Val Ser Ser Arg
 180 185 190
 Asp Ser Arg Gln Leu Asp Ala Phe Gly Asp Pro Ser Asp Asp Leu Leu
 195 200 205
 Pro Glu Ser Glu Ile Ile Val Ser Ser Ser Lys Lys Ala Ile Leu Asp
 210 215 220
 Ser Gln Asn Glu Ile Glu Ser Leu Ile Gln Ser Gly Asp Thr Ser Arg
 225 230 235 240
 Cys Ile Arg Ala Ile Asn Ser Ala Pro Ser Ala Ser Val Phe Gln Leu
 245 250 255
 Lys Thr Leu Ser Asn Asp Ile Ser Ile Ala Gly Arg Ala Phe Leu Asn
 260 265 270
 Gly Asn Ile Asp Leu Ile Glu Ala Cys Met Asn Ser Gly Lys Lys Leu
 275 280 285
 Asn Pro Asn Ile Thr Asp Asn Glu Lys Asn Thr Leu Leu His Gln Phe
 290 295 300
 Val Gly Tyr Phe Glu Arg Asp Pro Arg Met Leu Leu Asp Ala Gly Met
 305 310 315 320
 Arg Asn Leu Phe Leu Arg Leu Cys Met Asp Tyr Gly Phe Asp Ile Asn
 325 330 335
 His Lys Asn Ser Asn Gly Asn Thr Val Leu Asp Arg Leu Asn Asp Leu
 340 345 350
 Val Glu Gly Leu Ser Ser Ser Gln Val Asp Leu Glu Ser Ser Gly Ile

ES 2 581 880 T3

355		360		365											
Asp 370	Glu	Phe	Met	Ile	Ser	Leu	Leu	Ala	His	Ser	Arg	Met	Ser	Asp	Gln
						375					380				
Ala 385	Val	Lys	Asn	Ile	Ala	Thr	Ala	Gln	Asn	Glu	Phe	Phe	Ala	Arg	Asp
					390					395					400
Ser	Val	Tyr	Asn	Ile	Ser	Arg	Leu	Val	Asp	Thr	Ser	Ile	Val	Leu	Gln
				405					410					415	
Asn	Lys	Phe	Ser	Glu	Val	Phe	Tyr	Glu	Val	Cys	Gly	Arg	Ile	Leu	Ser
			420					425					430		
Glu	Glu	Ala	Gly	Lys	His	Lys	Gly	Val	Ala	Glu	Ala	Asn	Tyr	Ser	Arg
		435					440					445			
Leu	Asn	Lys	Ile	Leu	Asn	Asp	Glu	Cys	Leu	Arg	Lys	Thr	Leu	Ala	Asn
	450					455					460				
Thr	Asp	Ala	Asp	Gly	Asn	Asn	Val	Leu	Gln	Arg	Leu	Cys	Gln	Asp	Ile
465					470					475					480
Ala	Ser	Gly	Lys	Ile	Asn	Ala	Arg	Asp	Asp	Arg	Val	Leu	Lys	Leu	Phe
				485					490					495	
Glu	Thr	Ile	Ile	Ser	Asn	Leu	Lys	Asp	Lys	Asp	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu
			500					505					510		
Asp	Leu	Leu	Phe	Asn	Asn	Arg	Asn	Ser	Arg	Phe	Glu	Asn	Cys	Ile	Glu
	515						520					525			
Ala	Ile	Pro	Arg	Ile	Pro	Gly	Ala	Asp	Ala	Leu	Phe	Lys	Lys	Leu	Glu
	530					535					540				
Glu	Leu	Leu	Leu	Lys	Lys	Lys	Ile	Ala	Glu	Ser	Cys	Asp	Phe	Asn	Ser
545					550					555					560
Met	Leu	Val	Asn	Cys	Ala	Glu	Ser	Ala	Asn	Asp	Asn	Leu	Tyr	Asn	Tyr
				565					570					575	
Leu	Arg	Thr	Asn	Tyr	Ala	Val	Ile	Gly	Ile	Asn	Asn	Val	Asp	Ile	Asn
			580					585					590		

ES 2 581 880 T3

Gly Asn Ser Ser Leu Cys Lys Ala Val Val Thr Gly Ser Gln Gly Ile
 595 600 605

Val Lys Ala Val Leu Ser Thr Gly Thr Asn Ile Asn Arg Lys Asp Lys
 610 615 620

Asn Gly Asn Thr Pro Leu His Ala Leu Leu Ile Phe Met Met Ser Asn
 625 630 635 640

Pro Glu Leu Val Lys Glu Gln His Ile Ser Leu Val Lys Phe Leu Ala
 645 650 655

Ser Arg Gly Ala Leu Leu Asn Val Lys Asn Asn Met Asn Ile Ser Pro
 660 665 670

Ile Met Leu Ala Glu Ser Ile Asp Lys Lys Glu Glu Leu Ala Lys Lys
 675 680 685

Phe Thr Asn Gln Lys Val Ser Ile Leu Glu Ser Leu Ile Ala Gly Ser
 690 695 700

Glu Glu His Leu Gly Leu Lys Ser Lys Cys Ile Ser Glu Leu Lys Pro
 705 710 715 720

Tyr Ile Glu Leu Gly Lys Gly Met Lys Tyr Glu Asp Ile His Ala Asp
 725 730 735

Val Ile Gly Gly Val Leu Ser Ala Asp Met Cys Asn Ala Arg Leu Gln
 740 745 750

Ile Gly Lys Leu Leu Asn Gly Asp Phe Cys Lys Glu Asn Glu Leu Lys
 755 760 765

Thr Val Lys Phe Asn Phe Ser Asp Thr Asn Lys Gly Tyr Val Gln Asn
 770 775 780

Val Gly Lys Lys Arg Asn Tyr
 785 790

<210> 7

<211> 2283

<212> DNA

5 <213> Ehrlichia canis

<400> 7

ES 2 581 880 T3

gtaaaaaaat taagattalt attaaattca ataagtgagt taccgcaaga attaaaagat 60
 caaattttaa gtactagaag tactatagat aaattacgaa atagaattaa tgctgcata 120
 aagtctgacg atagagaagg tattgcacat gctgtagaat ctatggctag ttcttattgt 180
 gaattattag gacattgtag attaattttt aagaaattat atgatgaaaa tgctgataaa 240
 agtttgctag aattatgtat taaagaatat caatctgatt taaacaaatt attggaacaa 300
 ggtattgata tatgtgcttc agaagtctca tcagaatgta aggatttagt ttgtaaagta 360
 tgtgaagatg aatttgagaa atatgactct ttatctaaag tacaagatt caggaatta 420
 tctggtgaaa ttgctgattt ggatgataaa ttaacaagaa gggcttcttt tgttgagact 480
 tttgattat ttgacgtag attaagacat tatagggaaa ttttaggaga tggtgattta 540
 aaatttcgag agaggatagt tgaaaaatat caagaggatt taaaggaatt attagaatta 600
 tctgttgatc ttcatttggt aataaattta ccagcattag aagatttacg cgatcataga 660
 aatttagtgc atagagcatg taatgctgaa attgaaaaat atctaacttt atttgatgat 720
 caacaattac gtacattatc gcaagaagtg aataatgctc atggtgaatt gatacagatg 780

 ttttctaagt ttagtatatt tgttgatggc gttactggta ttgaacagag cacatctcaa 840
 gtagagcacc ctggttctga tattgctaaa agagatacta caacaccaa gcaacgtgtt 900
 gtgcaaggta aagatgatat acaatctagt gatagtgata gtgatagtga tagtaaatac 960
 ggtgatgatg atagtaaaaa agcatcagtt agtgcacctg ctgttgacca agttgtacct 1020
 gtagctgatg ttcaacctga aqctcagcta ggtgaaggat tggaaacatt agagtctagt 1080
 atagctgaag gacctgagtt gcttggtgat gcatctactg ctaagcaatc tatacctttt 1140
 gcgataacac catcaagtcc tgagacagtt gatgaaaaac ttgaaagttc tgggtgttagt 1200
 caagatggta ttacaacacc aggacaacgt gttgtgcaag gtaaagatga tatacaatct 1260
 agtgatagtg atagtgatag taaatacggg gatgatgata gtaaaaaagc atcagctagt 1320
 gcacctgctg ttgaccaagt tgtacctgta gctgatgttc aacctgaacc tcagctaggt 1380
 gaaaaattgg aacattaga gtctagtata actaaaggac ctgagttgcc tggtgatgca 1440
 tctactgcta agcaatctat accttttgcg ataacaccat caagtcctga gacagttgat 1500
 gaaaaacttg aaagtctgg tgttagtcaa gatggtatta caacaccagg acaacgtgtt 1560
 gtgcaaggta aagatgatat acaatctagt gatagtgata gtgatagtaa atacggtgat 1620

ES 2 581 880 T3

gatgatagta aaaaagcatc agctagtgca cctgctgttg accaagttgt accttctgac 1680
 actcgtgcag atggagtatc agaaccatta gcatctcatg tggatcaagg atctgatgta 1740
 cctggtgatg catctgttga tgggtttgat ttaagattag gacggttacc tactgagcaa 1800
 agtggattgt tgccacgtca tgaacaaaat gtaagagcat ttattttaga acagagtttg 1860
 ttagatcaat tatatatgga ctatatagat ttacaccctg atcagaaaag ttgtgaagct 1920
 tataattcag cattgcatgg atataatata agattagagt tacagaagga atataacagg 1980
 atttttgaat cacatgaatc agcatctcca aatgaaatta atagtttttc acaaaaatat 2040
 agagcagcat taagagatgt tgcgcaggat attgttaatc agggccaat gttttattct 2100
 tctagagatg caatgctatt aagggctaga gtagacacat tgtgtgatat gtgtcgttca 2160
 atacgtaatc tgtatatggt tgaattagat gccatagata aagaagaaaa atcgttacaa 2220
 tctgatatga aatctgcaag ttctagtgat aaaaagttga tacaagaaaa aataaaatta 2280
 ctt 2283

<210> 8

<211> 761

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia canis

<400> 8

Val Lys Lys Leu Arg Leu Leu Leu Asn Ser Ile Ser Glu Leu Pro Gln
 1 5 10 15
 Glu Leu Lys Asp Gln Ile Leu Ser Thr Arg Ser Thr Ile Asp Lys Leu
 20 | 25 30
 Arg Asn Arg Ile Asn Ala Cys Ile Lys Ser Asp Asp Arg Glu Gly Ile
 35 40 45
 Ala His Ala Val Glu Ser Met Ala Ser Ser Tyr Cys Glu Leu Leu Gly
 50 55 60
 His Cys Arg Leu Ile Phe Lys Lys Leu Tyr Asp Glu Asn Ala Asp Lys
 65 70 75 80
 Ser Leu Leu Glu Leu Cys Ile Lys Glu Tyr Gln Ser Asp Leu Asn Lys
 85 90 95

ES 2 581 880 T3

Leu Leu Glu Gln Gly Ile Asp Ile Cys Ala Ser Glu Val Ser Ser Glu
 100 105 110

Cys Lys Asp Leu Val Cys Lys Val Cys Glu Asp Glu Phe Glu Lys Tyr
 115 120 125

Asp Ser Leu Ser Lys Val Gln Arg Phe Arg Glu Leu Ser Gly Glu Ile
 130 135 140

Ala Asp Leu Asp Asp Lys Leu Thr Arg Arg Ala Ser Phe Val Glu Thr
 145 150 155 160

Phe Gly Leu Phe Ser Ser Arg Leu Arg His Tyr Arg Glu Ile Leu Gly
 165 170 175

Asp Gly Asp Leu Lys Phe Arg Glu Arg Ile Val Glu Lys Tyr Gln Glu
 180 185 190

Asp Leu Lys Glu Leu Leu Glu Leu Ser Val Asp Leu His Leu Leu Ile
 195 200 205

Asn Leu Pro Ala Leu Glu Asp Leu Arg Asp His Arg Asn Leu Val His
 210 215 220

Arg Ala Cys Asn Ala Glu Ile Glu Lys Tyr Leu Thr Leu Phe Asp Asp
 225 230 235 240

Gln Gln Leu Arg Thr Leu Ser Gln Glu Val Asn Asn Ala His Gly Glu
 245 250 255
 | |

Leu Ile Gln Met Phe Ser Lys Phe Ser Ile Phe Val Asp Gly Val Thr
 260 265 270

Gly Ile Glu Gln Ser Thr Ser Gln Val Glu His Pro Arg Ser Asp Ile
 275 280 285

Ala Lys Arg Asp Thr Thr Thr Pro Lys Gln Arg Val Val Gln Gly Lys
 290 295 300

Asp Asp Ile Gln Ser Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Asp Ser Lys Tyr
 305 310 315 320

Gly Asp Asp Asp Ser Lys Lys Ala Ser Val Ser Ala Pro Ala Val Asp

ES 2 581 880 T3

325						330						335												
Gln	Val	Val	Pro	Val	Ala	Asp	Val	Gln	Pro	Glu	Pro	Gln	Leu	Gly	Glu									
			340				345						350											
Gly	Leu	Glu	Thr	Leu	Glu	Ser	Ser	Ile	Ala	Glu	Gly	Pro	Glu	Leu	Pro									
		355					360					365												
Gly	Asp	Ala	Ser	Thr	Ala	Lys	Gln	Ser	Ile	Pro	Phe	Ala	Ile	Thr	Pro									
		370				375					380													
Ser	Ser	Pro	Glu	Thr	Val	Asp	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser	Ser	Gly	Val	Ser									
385					390					395						400								
Gln	Asp	Gly	Ile	Thr	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Val	Gln	Gly	Lys	Asp									
			405					410					415											
Asp	Ile	Gln	Ser	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Lys	Tyr	Gly	Asp	Asp									
		420					425					430												
Asp	Ser	Lys	Lys	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Asp	Gln	Val	Val									
		435					440					445												
Pro	Val	Ala	Asp	Val	Gln	Pro	Glu	Pro	Gln	Leu	Gly	Glu	Lys	Leu	Glu									
		450					455					460												
Thr	Leu	Glu	Ser	Ser	Ile	Thr	Lys	Gly	Pro	Glu	Leu	Pro	Gly	Asp	Ala									
465					470					475						480								
Ser	Thr	Ala	Lys	Gln	Ser	Ile	Pro	Phe	Ala	Ile	Thr	Pro	Ser	Ser	Pro									
			485					490					495											
Glu	Thr	Val	Asp	Glu	Lys	Leu	Glu	Ser	Ser	Gly	Val	Ser	Gln	Asp	Gly									
		500					505					510												
Ile	Thr	Thr	Pro	Gly	Gln	Arg	Val	Val	Gln	Gly	Lys	Asp	Asp	Ile	Gln									
		515					520					525												
Ser	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Asp	Ser	Lys	Tyr	Gly	Asp	Asp	Asp	Ser	Lys									
530					535					540														
Lys	Ala	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Ala	Val	Asp	Gln	Val	Val	Pro	Ser	Asp									

ES 2 581 880 T3

Ala Thr Gly Thr Thr Ala Cys Ala Cys Gly Thr Thr Cys Ala Ala Ala
 1 5 10 15

Ala Thr Cys Ala Thr Gly Thr Thr Gly Ala Thr Cys Ala Ala Cys Ala
 20 25 30

Thr Ala Cys Ala Ala Ala Thr Cys Ala Thr Ala Thr Ala Gly Ala Ala
 35 40 45

Cys Ala Thr Gly Ala Thr Gly Ala Thr Thr Ala Cys Cys Ala Thr Thr
 50 55 60

Thr Thr Ala Cys Thr Gly Gly Thr Cys Cys Thr Ala Cys Thr Ala Gly
 65 70 75 80

Thr Thr Thr Thr Gly Ala Ala Gly Thr Thr Ala Ala Thr Cys Thr Thr
 85 90 95

Thr Cys Thr Gly Ala Ala Gly Ala Ala Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ala
 100 105 110

Thr Gly Gly Ala Gly Thr Thr Ala Cys Ala Ala Gly Ala Ala Gly Thr
 115 120 125

Ala Thr Cys Thr Thr Cys Thr Ala Thr Thr Gly Ala Thr Ala Gly Thr
 130 135 140

Gly Thr Ala Gly Gly Ala Thr Gly Cys Gly Ala Ala Gly Ala Thr Thr
 145 150 155 160

Gly Thr Gly Ala Thr Cys Cys Ala Ala Ala Thr Thr Gly Thr Cys Gly
 165 170 175

Thr Thr Ala Thr Cys Cys Thr Thr Thr Ala Gly Ala Ala Thr Thr Ala
 180 185 190

Gly Thr Ala Gly Ala Ala Thr Gly Thr Cys Ala Gly Cys Gly Thr Ala
 195 200 205

ES 2 581 880 T3

Thr Thr Gly Ala Gly Gly Ala Ala Ala Gly Ala Cys Cys Ala Gly Thr
 210 215 220

Ala Thr Gly Cys Ala Ala Thr Gly Cys Ala Gly Gly Thr Thr Thr Ala
 225 230 235 240

Gly Ala Gly Ala Gly Cys Thr Thr Gly Ala Cys Thr Gly Thr Thr Gly
 245 250 255

Ala Thr Gly Cys Ala Thr Ala Thr Cys Ala Ala Thr Thr Ala Gly Gly
 260 265 270

Ala Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Thr Ala Gly Gly Thr Gly Gly Thr
 275 280 285

Thr Thr Thr Thr Thr Ala Ala Gly Thr Gly Cys Thr Ala Thr Gly Ala
 290 295 300

Ala Thr Thr Ala Cys Ala Thr Ala Thr Cys Thr Thr Ala Thr Ala Gly
 305 310 315 320

Cys Thr Ala Thr Cys Cys Thr Thr Gly Thr Thr Ala Thr Thr Ala Thr
 325 330 335

Thr Ala Thr Gly Ala Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr Ala
 340 345 350

Gly Ala Ala Ala Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Gly Ala Cys Thr Gly
 355 360 365

Thr Thr Gly Thr Cys Ala Thr Ala Ala Gly Ala Ala Thr Gly Cys Gly
 370 375 380

Thr Gly Thr Thr Ala Thr Thr Ala Cys Ala Ala Cys Thr Gly Thr Thr
 385 390 395 400

Gly Thr Gly Ala Thr Thr Gly Thr Gly Cys Gly Thr Ala Ala
 405 410

<210> 10

<211> 137

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia canis

<400> 10

ES 2 581 880 T3

Met Leu His Val Gln Asn His Val Asp Gln His Thr Asn His Ile Glu
 1 5 10 15
 His Asp Asp Tyr His Phe Thr Gly Pro Thr Ser Phe Glu Val Asn Leu
 20 25 30
 Ser Glu Glu Glu Lys Met Glu Leu Gln Glu Val Ser Ser Ile Asp Ser
 35 40 45
 Val Gly Cys Glu Asp Cys Asp Pro Asn Cys Arg Tyr Pro Leu Glu Leu
 50 55 60
 Val Glu Cys Gln Arg Ile Glu Glu Arg Pro Val Cys Asn Ala Gly Leu
 65 70 75 80
 Glu Ser Leu Thr Val Asp Ala Tyr Gln Leu Gly Leu Leu Leu Gly Gly
 85 90 95
 Phe Leu Ser Ala Met Asn Tyr Ile Ser Tyr Ser Tyr Pro Cys Tyr Tyr
 100 105 110
 Tyr Asp Cys Cys Asp Arg Asn Tyr Tyr Asp Cys Cys His Lys Asn Ala
 115 120 125
 Cys Tyr Tyr Asn Cys Cys Asp Cys Ala
 130 135

<210> 11
 <211> 3018
 <212> DNA

5 <213> Ehrlichia canis

<400> 11
 atgacgattt tcttagaaag tgatgatgat aagagtaact ttaagaagac attggagaac 60
 ggtactaaag acaagacaaa tctagataat acttattatg actatcatca tgaagatgat 120
 atgggaaata ctgaatatca ttatgtgagt ttggatagag tggatcatgt taagatgcct 180
 gaagagcctg taggttatgg tggagatact ttacctattg ttcctactac agctgctagt 240
 gtatctggta gtgatgcagg cgttgctgta ggtaatgtta aagatdddga agataatggt 300
 tttcatcata catctactat aagaaacgat gaattgaaga tagattdtacg aatacatact 360

ES 2 581 880 T3

ttaaaggatt tatctgataa aagattacgt gaaattgaaa agggatttaa tgatacggta 420
 acaaaattta aaaataattt tyggttagaa ccaaatgatg gagaactat ttttgattta 480
 tacctttttg atgataagga acaatataat tattatggaa agctttataa cttaggaatt 540
 agtggatctg gaggtatgac tttctatgga aatgctaagtg ttccatataa aatttatgta 600
 catcaatatg gtgaaatatt gaatttaaaa catgaattaa ctcatgcatt agaaagtat 660
 gcatctggac ataaattgca tggttctgac gtaaatagca gaatatttac ggaaggatta 720
 gctgattata tccaagaaga taatagtttt attatgagag gattaaagga tcgagagatc 780
 acttcagatg tattgaaaga ttcttctggt aatgtagatc atttaagtgg tgttgcagtg 840
 aatgaaaatc agaggttaag ttatagtata ggacatgcat ttgtaagctt tttacaagag 900
 aaatatecta agttaatttc ggaatattta aacgcattaa aagaggataa tattatcgt 960
 gctaaagaaa taattagtat ggataagtat ccagattttg agccgtgggt gaagtctaaa 1020
 gacattagtt tatattttaga aaatatgaat gtattaaagt taggattagg tgagaaaatg 1080
 ttttctgctg aaagtgctag ctattttgaa gatcaaggtg tcaataaaga atattacat 1140
 gaaaatattt atgatatgag tggtaaacta gtaggtgaaa tgtcacctgt agtgcattat 1200
 gcacaaaaaa atgtgattcg tatttggaat attgcaagtc ctgatatgat agaggtgcga 1260
 ccagaatata actttctgaa attggttaact actccatctg gtaagtctgc atatgtatat 1320
 tgtgataaga atgggcatga gtattttaat actaaagatt acatagattc tgcgtttaat 1380
 atattggcaa gatatgatgt taagcttctg gaaagtagtg atgctttgga tattagaggt 1440
 cgttactcag atgctgctaa agtgtttagt aagctgccta atgctgattt gctgttgat 1500
 aagtttttag aaaaaatagg ttatagtagt tataagcaga taataatgag taatccagaa 1560
 cagcttaatt ctattaaggc ttatgtagta aaagaagtgt ttgaaaattt tagggaatct 1620
 gaggtcaaaa aggtgttgag tggtgagtct catccggaag taagaaatgt attaatggat 1680
 cttacctatg ttgatttaaa gagtggtata ggagtaaatg gtgcagatat tgacagtatt 1740
 atttctaate cagatgtaat gttgcgtact gctgtgttag gtaaaggaaa tgcaagtggg 1800
 atatctctat atgtagatga tcagaaagt ggtgagctgt caactgaagc aggttattgt 1860
 gttaaaaatc ttgatactgg taaagtgtat tttatgttcc ataagtgtgt tggaatgata 1920
 gcaagtgggt atgaagacag agcatatatg gttgtattag aaaaagatgg taagtttact 1980
 actgctctag ttaataatat acaaaaagca gcagatggaa atgttgtatg ggataatcaa 2040

ES 2 581 880 T3

tttaatcacc egaatattaa taacttgcac tcaaattata aggagctggt gttaaatgat 2100
 gcttcagtta aagattactc tcatcttgcg gatgtgaaat ttaataaaga tgatacagta 2160
 attgttaaag gtgaattatt agatgataaa ggtactgtaa gtgtagatga tgatgtacat 2220
 cgtgcagttg ttaagcatga tgatcaaata ctacatcagt ttaagagtat gtctttttac 2280
 attactgaac catcagctga ttcaggtgac aattatggaa gtgatttttt catttctgat 2340
 gaaggaaaaa atcttagatt tcaacttctc aaagctatta cgcatttgaa attggttaat 2400
 gttaatggaa ataataagtt ggtaccatgt actaaagatg ggaatgaaca tcctgaaggt 2460
 atgccatctg atttaacgga tgaatataga tatatagatc ctatttttgc tcatacattt 2520
 gagaaacaaa gttattctaa aaatagtatt agtgttgggt tagtggactt cagtaaatat 2580
 aaagaaggat ctatgtttaa attacagcat tattctgatg attatcatat tcataaggat 2640
 gaacaaggta atgttattag gcctaataac agatcttacg ttacaaaagt ggatttagta 2700
 tatgatgata aagttattgg gatgttgtct gatagtataa atcaatttca gggatgatatt 2760
 ttcatttctg caagccttaa ttatagccac aatgattttc tttcatctaa gtactttcag 2820
 aaagttaata ttgaggcgtt agaaaatgga atatatagtg gaagatatga tgtaggagat 2880
 ggtgacccaaa tagcaggtct taatactgat acaggttata gtgataaagc tattttttac 2940
 tttaaaaatg atagcgcacc tactgatatg ccggctagtg atgttactac tattttacct 3000
 tatataaatg agctttaa 3018

<210> 12
 <211> 1005
 <212> PRT
 5 <213> Ehrlichia canis

<400> 12
 Met Thr Ile Phe Leu Glu Ser Asp Asp Asp Lys Ser Asn Phe Lys Lys
 1 5 10 15
 Thr Leu Glu Asn Gly Thr Lys Asp Lys Thr Asn Leu Asp Asn Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Asp Tyr His His Glu Asp Asp Met Gly Asn Thr Glu Tyr His Tyr
 35 40 45
 Val Ser Leu Asp Arg Val Asp His Val Lys Met Pro Glu Glu Pro Val
 50 55 60

ES 2 581 880 T3

Gly Tyr Gly Gly Asp Thr Leu Pro Ile Val Pro Thr Thr Ala Ala Ser
 65 70 75 80
 Val Ser Gly Ser Asp Ala Gly Val Ala Val Gly Asn Val Lys Asp Phe
 85 90 95
 Glu Asp Asn Val Phe His His Thr Ser Thr Ile Arg Asn Asp Glu Leu
 100 105 110
 Lys Ile Asp Leu Arg Ile His Thr Leu Lys Asp Leu Ser Asp Lys Arg
 115 120 125
 Leu Arg Glu Ile Glu Lys Gly Phe Asn Asp Thr Val Thr Lys Phe Lys
 130 135 140
 Asn Asn Phe Gly Leu Glu Pro Asn Asp Gly Glu Thr Ile Phe Asp Leu
 145 150 155 160
 Tyr Leu Phe Asp Asp Lys Glu Gln Tyr Asn Tyr Tyr Gly Lys Leu Tyr
 165 170 175
 Asn Leu Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Met Thr Phe Tyr Gly Asn Ala
 180 185 190
 Asn Val Pro Tyr Lys Ile Tyr Val His Gln Tyr Gly Glu Ile Leu Asn
 195 200 205
 Leu Lys His Glu Leu Thr His Ala Leu Glu Ser Tyr Ala Ser Gly His
 210 215 220
 Lys Leu His Gly Ser Asp Val Asn Ser Arg Ile Phe Thr Glu Gly Leu
 225 230 235 240
 Ala Asp Tyr Ile Gln Glu Asp Asn Ser Phe Ile Met Arg Gly Leu Lys
 245 250 255
 Asp Arg Glu Ile Thr Ser Asp Val Leu Lys Asp Ser Ser Gly Asn Val
 260 265 270
 Asp His Leu Ser Gly Val Ala Val Asn Glu Asn Gln Arg Leu Ser Tyr
 275 280 285

ES 2 581 880 T3

Ser Ile Gly His Ala Phe Val Ser Phe Leu Gln Glu Lys Tyr Pro Lys
 290 295 300

Leu Ile Ser Glu Tyr Leu Asn Ala Leu Lys Glu Asp Asn Ile Ile Arg
 305 310 315 320

Ala Lys Glu Ile Ile Ser Met Asp Lys Tyr Pro Asp Phe Glu Pro Trp
 325 330 335

Val Lys Ser Lys Asp Ile Ser Leu Tyr Leu Glu Asn Met Asn Val Leu
 340 345 350

Lys Leu Gly Leu Gly Glu Lys Met Phe Ser Ala Glu Ser Ala Ser Tyr
 355 360 365

Phe Glu Asp Gln Gly Val Asn Lys Glu Tyr Tyr His Glu Asn Ile Tyr
 370 375 380

Asp Met Ser Gly Lys Leu Val Gly Glu Met Ser Pro Val Val His Tyr
 385 390 395 400

Ala Gln Lys Asn Val Ile Arg Ile Trp Asn Ile Ala Ser Pro Asp Met
 405 410 415

Ile Glu Val Arg Pro Glu Tyr Asn Phe Leu Lys Leu Val Thr Thr Pro
 420 425 430

Ser Gly Lys Ser Ala Tyr Val Tyr Cys Asp Lys Asn Gly His Glu Tyr
 435 440 445

Phe Asn Thr Lys Asp Tyr Ile Asp Ser Ala Phe Asn Ile Leu Ala Arg
 450 455 460

Tyr Asp Val Lys Leu Arg Glu Ser Ser Asp Ala Leu Asp Ile Arg Gly
 465 470 475 480

Arg Tyr Ser Asp Ala Ala Lys Val Phe Ser Lys Leu Pro Asn Ala Asp
 485 490 495

Leu Leu Leu Asp Lys Phe Leu Glu Lys Ile Gly Tyr Ser Ser Tyr Lys
 500 505 510

ES 2 581 880 T3

Gln Ile Ile Met Ser Asn Pro Glu Gln Leu Asn Ser Ile Lys Ala Tyr
 515 520 525

Val Val Lys Glu Val Phe Glu Asn Phe Arg Glu Ser Glu Val Lys Lys
 530 535 540

Val Leu Ser Gly Glu Ser His Pro Glu Val Arg Asn Val Leu Met Asp
 545 550 555 560

Leu Thr Tyr Val Asp Leu Lys Ser Val Ile Gly Val Asn Gly Ala Asp
 565 570 575

Ile Asp Ser Ile Ile Ser Asn Pro Asp Val Met Leu Arg Thr Ala Val
 580 585 590

Leu Gly Lys Gly Asn Ala Ser Gly Ile Ser Leu Tyr Val Asp Asp Gln
 595 600 605

Lys Val Gly Glu Leu Ser Thr Glu Ala Gly Tyr Cys Val Lys Asn Leu
 610 615 620

Asp Thr Gly Lys Val Tyr Phe Met Phe His Asn Val Val Gly Met Ile
 625 630 635 640

Ala Ser Gly Tyr Glu Asp Arg Ala Tyr Met Val Val Leu Glu Lys Asp
 645 650 655

Gly Lys Phe Thr Thr Ala Leu Val Asn Asn Ile Gln Lys Ala Ala Asp
 660 665 670

Gly Asn Val Val Trp Asp Asn Gln Phe Asn His Pro Asn Ile Asn Asn
 675 680 685

Leu His Ser Asn Tyr Lys Glu Leu Leu Leu Asn Asp Ala Ser Val Lys
 690 695 700

Asp Tyr Ser His Leu Ala Asp Val Lys Phe Asn Lys Asp Asp Thr Val
 705 710 715 720

Ile Val Lys Gly Glu Leu Leu Asp Asp Lys Gly Thr Val Ser Val Asp
 725 730 735

Asp Asp Val His Arg Ala Val Val Lys His Asp Asp Gln Ile Leu His

ES 2 581 880 T3

740	745	750																				
Gln	Phe	Lys	Ser	Met	Ser	Phe	Tyr	Ile	Thr	Glu	Pro	Ser	Ala	Asp	Ser							
		755					760					765										
Gly	Asp	Asn	Tyr	Gly	Ser	Asp	Phe	Phe	Ile	Ser	Asp	Glu	Gly	Lys	Asn							
	770					775					780											
Leu	Arg	Phe	Gln	Leu	Pro	Lys	Ala	Ile	Thr	His	Leu	Lys	Leu	Val	Asn							
785					790					795					800							
Val	Asn	Gly	Asn	Asn	Lys	Leu	Val	Pro	Cys	Thr	Lys	Asp	Gly	Asn	Glu							
			805						810					815								
His	Pro	Glu	Gly	Met	Pro	Ser	Asp	Leu	Thr	Asp	Glu	Tyr	Arg	Tyr	Ile							
			820					825					830									
Asp	Pro	Ile	Phe	Ala	His	Thr	Phe	Glu	Lys	Gln	Ser	Tyr	Ser	Lys	Asn							
		835					840					845										
Ser	Ile	Ser	Val	Gly	Leu	Val	Asp	Phe	Ser	Lys	Tyr	Lys	Glu	Gly	Ser							
	850					855					860											
Met	Phe	Lys	Leu	Gln	His	Tyr	Ser	Asp	Asp	Tyr	His	Ile	His	Lys	Asp							
865					870					875					880							
Glu	Gln	Gly	Asn	Val	Ile	Arg	Pro	Asn	Asn	Arg	Ser	Tyr	Val	Thr	Lys							
			885						890					895								
Val	Asp	Leu	Val	Tyr	Asp	Asp	Lys	Val	Ile	Gly	Met	Leu	Ser	Asp	Ser							
		900						905					910									
Ile	Asn	Gln	Phe	Gln	Gly	Asp	Ile	Phe	Ile	Ser	Ala	Ser	Leu	Asn	Tyr							
		915					920					925										
Ser	His	Asn	Asp	Phe	Leu	Ser	Ser	Lys	Tyr	Phe	Gln	Lys	Val	Asn	Ile							
	930					935					940											
Glu	Ala	Leu	Glu	Asn	Gly	Ile	Tyr	Ser	Gly	Arg	Tyr	Asp	Val	Gly	Asp							
945					950					955					960							
Gly	Asp	Gln	Ile	Ala	Gly	Leu	Asn	Thr	Asp	Thr	Gly	Tyr	Ser	Asp	Lys							
				965					970					975								
Ala	Ile	Phe	Tyr	Phe	Lys	Asn	Asp	Ser	Ala	Ser	Thr	Asp	Met	Pro	Ala							
		980						985					990									
Ser	Asp	Val	Thr	Thr	Ile	Leu	Pro	Tyr	Ile	Asn	Glu	Leu										
	995						1000					1005										

<210> 13
 <211> 2172
 <212> DNA

5

ES 2 581 880 T3

<213> Ehrlichia canis

<400> 13

atggatagta taagtgcaaa tcacatacgc aatattttat tccttgtttt aggcgcattt	60
tttgactgg aattttgctt ttatttatca ggtgtattat tcattttaat ggtctgggga	120
ccaaattacc tagattttaa tgctataaat ccagtttga gtgattttcc agacagaatt	180
tggccaacta tttttgacta tgtacaacat tggtggaaga acccttctgc atacgatgca	240
gttttattac ttaagctaata aagctcatta tgtacaccag taggtattct aagcatagta	300
ttatggaacc ttagaaatat attattcgat tggaggccat ttaagaagaa agaactactg	360
catggagatt caagatgggc aacagaaaaa gatattcgca aaataggatt acgtagtaga	420
aaaggaatat tattagggaa agacaagaga ggatatctca ttgcagatgg atatcaacat	480
gcattgttat ttgcaccaac tggatccgga aaagggtgtag gttttgtaat accaaactta	540
ttattctggg aagattctgt agtagtacac gatataaaat tagagaacta tgatcttaca	600
agtgggtgga gaaaaaaaaa gggacaagaa gttttcgtgt ggaaccocagc acaacctgac	660
ggtataagtc actgttacaa cccattagat tggataagct ctaagcctgg acaaatggta	720
gatgatgtac aaaaaattgc caatctaata atgcctgaac aagatTTTTg gtataacgaa	780
gcacgtagtt tttttgtagg agtagtatta tacttactag cagtaccaga aaaagtaaaa	840
tcctttggag aagttgtaag aacaatgcgc agcgatgacg tagtctacaa cttagcagta	900
gtactagaca caatagggaa aaagattcac ccagttgcat acatgaatat agctgcattt	960
ttacaaaaag cagacaaaga acgctcaggt gttgtatcaa ctatgaactc atctttagaa	1020
ttatgggcaa acccattaat agatacagca acagcatcaa gtgattttaa tattcaagaa	1080
tttaaaagga aaaaagtaac agtatatggt ggattaacac cagataattt aactcgtctt	1140
agacctttaa tgcaggtatt ttatcaacaa gctacagaat ttttatgtag aactttacca	1200

ES 2 581 880 T3

tcagatgatg aaccatatgg tgtactgttc ttaatggatg agtttccaac attaggaaaa 1260
atggagcaat ttcaaacagg tatcgcatat ttccgtggat atagagttag actatTTTTTg 1320
attattcaag atactgaaca gcttaagggT atatatgaag aagcaggaat gaactcattc 1380
ttatcaaact ctacttatag aataactttt gctgcaaata atatagaaac tgcaaattta 1440
atatcacagt taataggaaa taaaactggt aaccaagagt ctttaaacag acctaaattt 1500
ttagatttga accctgcatc acgttcatta catatatcag aaacacaaag agctttacta 1560
ttacctcaag aagtaataat gttaccaga gatgagcaaa tacttttaaat agaacttact 1620
tattctataa aatcaaagaa aataaaatac tatgaagaca aaaatTTTtac aaaaaacta 1680
ttaaagagta cctttgttcc aactcaagag ccttatgatc ccaacaaaac aaaaacagca 1740
acaaaagaaa acgaagaacc tatgccaagt attgaaagcg atcttctctaa aaatacatct 1800
gacaatactg aaaacaatat ggaagatggt gcaatgtaca gcagcataga agaagattat 1860
gacgatgatg atgatgattt taatTTTgaa gacttagatg aatatatgga tgaagaagaa 1920
gattatgatg atgaagaata tgatgatata gattatgatg ataataacaa tagtaatgag 1980
gagtatgaag aagataatcc agaagaagat gacaatagca ataacttaga cgatgaggaa 2040
gaggaagaag ataattattat agattatgaa gatgaagaag aatatgatga taacatagac 2100
tacaagatg atgacaataa ctacaacaaa gataccactg acgatcaaga ctcaaaaaaa 2160
cataatgaat ag 2172

<210> 14
<211> 723
<212> PRT
5 <213> Ehrlichia canis

<400> 14
Met Asp Ser Ile Ser Ala Asn His Ile Arg Asn Ile Leu Phe Leu Val
1 5 10 15
Leu Gly Ala Phe Phe Gly Leu Glu Phe Cys Phe Tyr Leu Ser Gly Val
20 25 30
Leu Phe Ile Leu Met Val Trp Gly Pro Asn Tyr Leu Asp Phe Asn Ala
35 40 45
Ile Asn Pro Ser Leu Ser Asp Phe Pro Asp Arg Ile Trp Pro Thr Ile
50 55 60

ES 2 581 880 T3

Phe Asp Tyr Val Gln His Trp Trp Lys Asn Pro Ser Ala Tyr Asp Ala
 65 70 75 80
 Val Leu Leu Leu Lys Leu Ile Thr Ser Leu Cys Thr Pro Val Gly Ile
 85 90 95
 Leu Ser Ile Val Leu Trp Asn Leu Arg Asn Ile Leu Phe Asp Trp Arg
 100 105 110
 Pro Phe Lys Lys Lys Glu Ser Leu His Gly Asp Ser Arg Trp Ala Thr
 115 120 125
 Glu Lys Asp Ile Arg Lys Ile Gly Leu Arg Ser Arg Lys Gly Ile Leu
 130 135 140
 Leu Gly Lys Asp Lys Arg Gly Tyr Leu Ile Ala Asp Gly Tyr Gln His
 145 150 155 160
 Ala Leu Leu Phe Ala Pro Thr Gly Ser Gly Lys Gly Val Gly Phe Val
 165 170 175
 Ile Pro Asn Leu Leu Phe Trp Glu Asp Ser Val Val Val His Asp Ile
 180 185 190
 Lys Leu Glu Asn Tyr Asp Leu Thr Ser Gly Trp Arg Lys Lys Arg Gly
 195 200 205
 Gln Glu Val Phe Val Trp Asn Pro Ala Gln Pro Asp Gly Ile Ser His
 210 215 220
 Cys Tyr Asn Pro Leu Asp Trp Ile Ser Ser Lys Pro Gly Gln Met Val
 225 230 235 240
 Asp Asp Val Gln Lys Ile Ala Asn Leu Ile Met Pro Glu Gln Asp Phe
 245 250 255
 Trp Tyr Asn Glu Ala Arg Ser Leu Phe Val Gly Val Val Leu Tyr Leu
 260 265 270
 Leu Ala Val Pro Glu Lys Val Lys Ser Phe Gly Glu Val Val Arg Thr
 275 280 285

ES 2 581 880 T3

Met Arg Ser Asp Asp Val Val Tyr Asn Leu Ala Val Val Leu Asp Thr
 290 295 300

Ile Gly Lys Lys Ile His Pro Val Ala Tyr Met Asn Ile Ala Ala Phe
 305 310 315 320

Leu Gln Lys Ala Asp Lys Glu Arg Ser Gly Val Val Ser Thr Met Asn
 325 330 335

Ser Ser Leu Glu Leu Trp Ala Asn Pro Leu Ile Asp Thr Ala Thr Ala
 340 345 350

Ser Ser Asp Phe Asn Ile Gln Glu Phe Lys Arg Lys Lys Val Thr Val
 355 360 365

Tyr Val Gly Leu Thr Pro Asp Asn Leu Thr Arg Leu Arg Pro Leu Met
 370 375 380

Gln Val Phe Tyr Gln Gln Ala Thr Glu Phe Leu Cys Arg Thr Leu Pro
 385 390 395 400

Ser Asp Asp Glu Pro Tyr Gly Val Leu Phe Leu Met Asp Glu Phe Pro
 405 410 415

Thr Leu Gly Lys Met Glu Gln Phe Gln Thr Gly Ile Ala Tyr Phe Arg
 420 425 430

Gly Tyr Arg Val Arg Leu Phe Leu Ile Ile Gln Asp Thr Glu Gln Leu
 435 440 445

Lys Gly Ile Tyr Glu Glu Ala Gly Met Asn Ser Phe Leu Ser Asn Ser
 450 455 460

Thr Tyr Arg Ile Thr Phe Ala Ala Asn Asn Ile Glu Thr Ala Asn Leu
 465 470 475 480

Ile Ser Gln Leu Ile Gly Asn Lys Thr Val Asn Gln Glu Ser Leu Asn
 485 490 495

Arg Pro Lys Phe Leu Asp Leu Asn Pro Ala Ser Arg Ser Leu His Ile
 500 505 510

Ser Glu Thr Gln Arg Ala Leu Leu Leu Pro Gln Glu Val Ile Met Leu

ES 2 581 880 T3

Met Asp Ile Asp Asn Asn Asn Val Thr Thr Ser Ser Thr Gln Asp Lys
 1 5 10 15

Ser Gly Asn Leu Met Glu Val Ile Met Arg Ile Leu Asn Phe Gly Asn
 20 25 30

Asn Ser Asp Glu Lys Val Ser Asn Glu Asp Thr Lys Val Leu Val Glu
 35 40 45

Ser Leu Gln Pro Ala Val Asn Asp Asn Val Gly Asn Pro Ser Ser Glu
 50 55 60

Val Gly Lys Glu Glu Asn Ala Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln
 65 70 75 80

Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Lys
 85 90 95

Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala
 100 105 110

Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Ile Glu His Ser Ser Ser
 115 120 125

Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Lys Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro
 130 | 135 140 |

Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu
 145 150 155 160

His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu
 165 170 175

Glu Asn Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp
 180 185 190

Gly Ser Ile Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Lys
 195 200 205

ES 2 581 880 T3

Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln
 210 215 220

Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu
 225 230 235 240

Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Asn Thr Pro Glu Val Lys Ala
 245 250 255

Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser
 260 265 270

Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Lys Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro
 275 280 285

Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu
 290 295 300

His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu
 305 310 315 320

Glu Asn Thr Pro Glu Val Arg Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp
 325 330 335

Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu
 340 345 350

Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln
 355 360 365
 | |

Pro Ala Val Asp Ser Ser Ile Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Lys
 370 375 380

Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala
 385 390 395 400

Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser
 405 410 415

Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Asn Thr Pro
 420 425 430

Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu

ES 2 581 880 T3

Lys Glu Glu Asn Ala Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala
 1 5 10 15
 Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Lys Lys Val
 20 25 30
 Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp
 35 40 45
 Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Ile Glu His Ser Ser Ser Glu Val
 50 55 60
 Gly Glu Lys Val Ser Lys Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val
 65 70 75 80
 Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu His Ser
 85 90 95
 Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Asn
 100 105 110
 Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser
 115 120 125
 Ile Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Lys Thr Ser
 130 135 140
 Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala
 145 150 155 160
 Val Asp Asp Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val
 165 170 175

ES 2 581 880 T3

Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Asn Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp
 180 185 190

Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val
 195 200 205

Gly Glu Lys Val Ser Lys Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val
 210 215 220

Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Asp Ser Val Glu His Ser
 225 230 235 240

Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Asn
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Arg Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser
 260 265 270

Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser
 275 280 285

Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala
 290 295 300

Val Asp Ser Ser Ile Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Lys Lys Val
 305 310 315 320

Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp
 325 330 335

Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val
 340 345 350

Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Asn Thr Pro Glu Val
 355 360 365

Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser
 370 375 380

Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys Val Ser Glu Thr Ser Lys Glu Glu Asn
 385 390 395 400

Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser

ES 2 581 880 T3

	405		410		415										
Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser
			420					425					430		
Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp	Leu	Gln	Pro	Ala
			435				440					445			
Val	Asp	Asp	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val	Gly	Glu	Lys	Val
	450					455					460				
Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val	Lys	Ala	Glu	Asp
465					470					475					480
Leu	Gln	Pro	Ala	Val	Asp	Gly	Ser	Val	Glu	His	Ser	Ser	Ser	Glu	Val
				485					490					495	
Gly	Glu	Lys	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Pro	Glu	Val
			500					505					510		
Lys	Ala	Glu													
			515												

<210> 17

<211> 36

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia canis

<220>

<221> CARACT_MISCELÁNEA

<222> (4)..(4)

<223> X representa cualquier aminoácido

10 <220>

<221> CARACT_MISCELÁNEA

<222> (9)..(9)

<223> X representa cualquier aminoácido

15 <220>

<221> CARACT_MISCELÁNEA

<222> (19)..(19)

<223> X representa cualquier aminoácido

20 <220>

<221> CARACT_MISCELÁNEA

<222> (21)..(21)

<223> X representa cualquier aminoácido

25 <220>

<221> CARACT_MISCELÁNEA

<222> (30)..(30)

<223> X representa cualquier aminoácido

30 <220>

<221> CARACT_MISCELÁNEA

<222> (34)..(34)

<223> X representa cualquier aminoácido

<400> 17

ES 2 581 880 T3

Lys Glu Glu Xaa Thr Pro Glu Val Xaa Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala
 1 5 10 15

Val Asp Xaa Ser Xaa Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Xaa Lys Val
 20 25 30

Ser Xaa Thr Ser
 35

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia canis

<400> 18

Cys Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser
 1 5 10 15

Val Glu His

<210> 19

<211> 27

10 <212> PRT

<213> Ehrlichia canis

<400> 19

Cys Glu Val Gly Lys Glu Glu Asn Ala Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp
 1 5 10 15

Leu Gln Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His
 20 25

<210> 20

15 <211> 37

<212> PRT

<213> Ehrlichia canis

<400> 20

Cys Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro
 1 5 10 15

Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Glu Lys
 20 25 30

Val Ser Glu Thr Ser
 35

20 <210> 21

<211> 48

<212> PRT

<213> Ehrlichia canis

<220>

25 <221> CARACT_MISCELÁNEA

<222> (1)..(15)

<223> X representa cualquier aminoácido o no aminoácido

<220>

30 <221> CARACT_MISCELÁNEA

<222> (34)..(48)

<223> X representa cualquier aminoácido o no aminoácido

<400> 21

ES 2 581 880 T3

Xaa Pro
 1 5 10 15

Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln | Pro Ala Val Asp Gly Ser Val Glu
 20 25 30

His Xaa
 35 40 45

<210> 22

<211> 37

<212> PRT

5 <213> Ehrlichia canis

<220>

<221> CARACT_MISCELÁNEA

<222> (31)..(31)

<223> X es K o E

10 <400> 22

Cys Lys Glu Glu Ser Thr Pro Glu Val Lys Ala Glu Asp Leu Gln Pro
 1 5 10 15

Ala Val Asp Gly Ser Val Glu His Ser Ser Ser Glu Val Gly Xaa Lys
 20 25 30

Val Ser Glu Thr Ser
 35

REIVINDICACIONES

1. Un método para distinguir entre un animal que se ha infectado con *E. canis* de un animal que no se ha infectado con *E. canis*, el método que comprende:
- 5 (a) poner en contacto una muestra biológica de un animal con uno o más polipéptidos purificados que comprenden la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o sus combinaciones; y
- (b) detectar si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a los uno o más polipéptidos purificados;
- Donde si los anticuerpos de la muestra se une específicamente a uno o más polipéptidos purificados, entonces el animal se ha infectado con *E. canis*.
- 10 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el uno o más polipéptidos purificados se unen a un soporte sólido.
3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el uno o más polipéptidos purificados están en una forma multimérica.
- 15 4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde el uno o más polipéptidos purificados se unen a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un ligador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia-detención, un dominio de transmembrana, un ligando de purificación de proteína, o una combinación de estos.
- 20 5. Un método para distinguir entre animales que (1) se han infectado con *Ehrlichia canis* y animales que (2) no se han infectado con *E. canis* independientemente de si el animal se ha vacunado con una vacuna anti-*E. canis*, el método que comprende:
- 25 (a) poner en contacto una muestra biológica de un animal con uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados que no se unen específicamente a los anticuerpos que son un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna anti-*E. canis*; donde el uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o sus combinaciones;
- (b) detectar si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a los uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados; y
- (c) donde si los anticuerpos de la muestra se unen específicamente a los uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados, entonces el animal se ha infectado con *E. canis*.
- 30 6. Un método para determinar la presencia o ausencia de un anticuerpo o fragmento de este, en una muestra de prueba, donde el anticuerpo o fragmento de este se une específicamente a uno o más polipéptidos purificados que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o sus combinaciones que comprende:
- 35 poner en contacto la muestra de prueba con uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados que consisten en la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o sus combinaciones en condiciones adecuadas para la unión específica del uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados al anticuerpo o fragmento de este; y detectar la presencia o ausencia de unión específica;
- 40 donde la presencia de unión específica indica la presencia del anticuerpo o fragmento de este y donde la ausencia de unión específica indica la ausencia del anticuerpo o fragmento de este.
7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el método además comprende detectar la cantidad de unión específica.
- 45 8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o sus combinaciones se inmovilizan en un soporte sólido.
9. Una composición que comprende uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados que consisten en una secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22 o sus combinaciones.
- 50 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, donde el uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados están en una forma multimérica.

11. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, donde el uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados se ligan a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un ligador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia-detención, un dominio de transmembrana, un ligando de purificación de proteína, o una combinación de estos.
- 5 12. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde el uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados se unen a un soporte sólido.
13. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde el uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados están en una forma multimérica.
- 10 14. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde el uno o más polipéptidos de *E. canis* purificados se ligan a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un ligador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia-detención, un dominio de transmembrana, un ligando de purificación de proteína, o una combinación de estos.
- 15 15. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO:22 o sus combinaciones están en una forma multimérica.
- 20 16. El método de acuerdo con la reivindicación 6, donde el uno o más polipéptidos sintetizados químicamente, purificados que consiste en la secuencia de aminoácidos expuesta en las SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, o sus combinaciones se ligan a una proteína heteróloga, un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un ligador de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia-detención, un dominio de transmembrana, un ligando de purificación de proteína, o una combinación de estos.

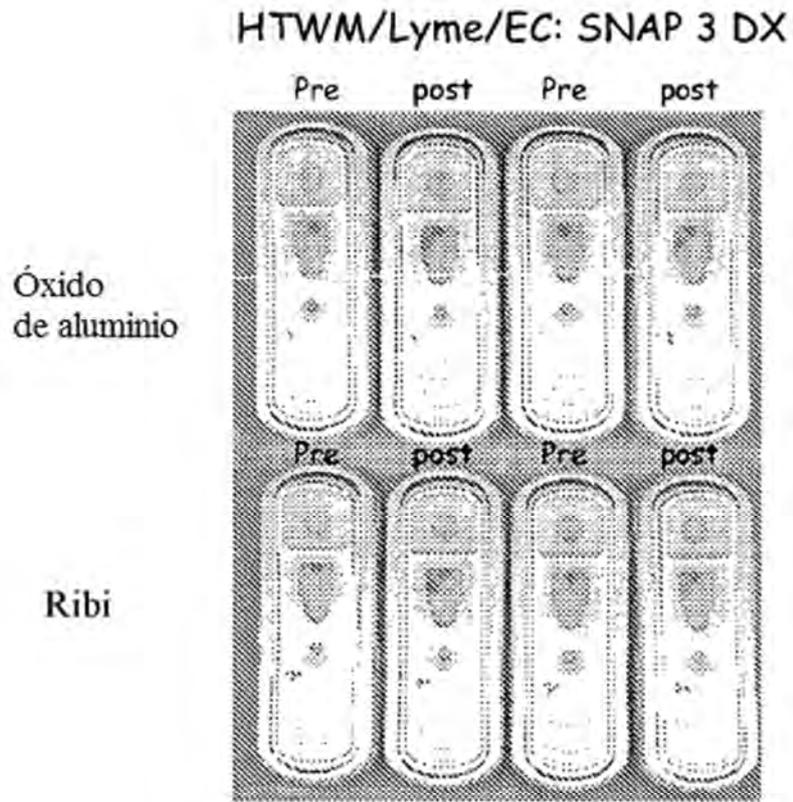


Figura 1

Análisis de gel 2D de *E. canis* aislados – teñidos
con azul Coomassie BioSafe

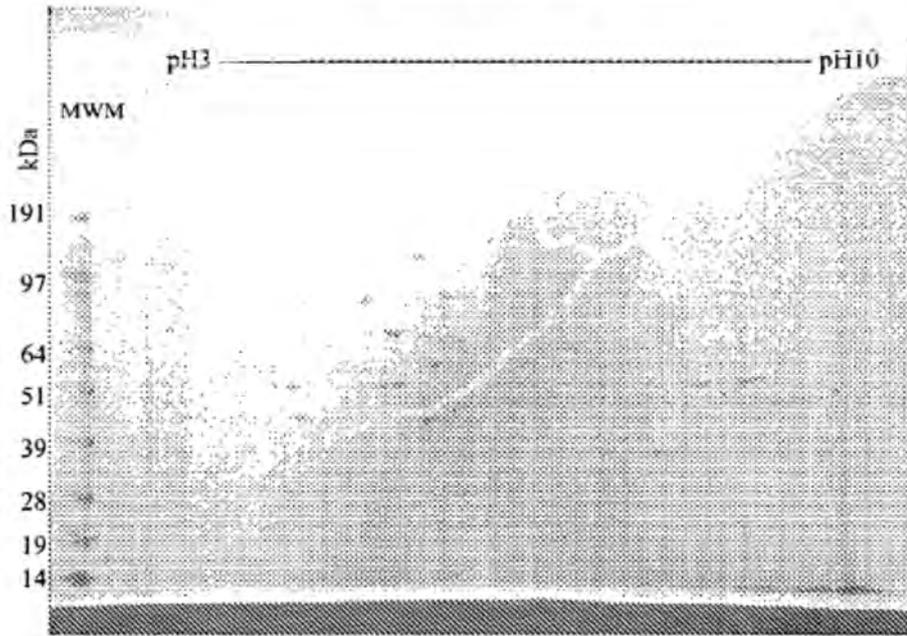


Figura 2

Transferencia Western de proteínas de *E. canis* resueltas usando
geles 2D analizados con plasma canino normal

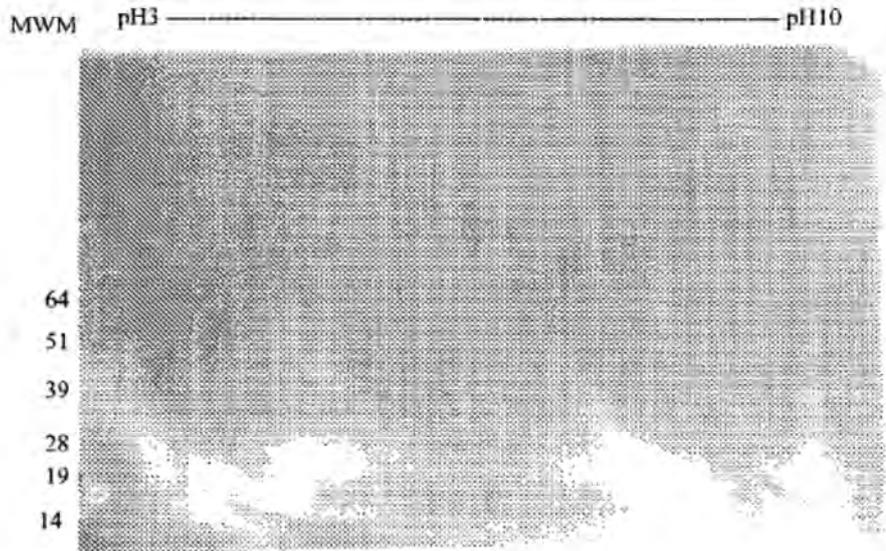


Figura 3

Análisis Western con mezcla de sueros vacunados
de 4 perros vacunados — 1:100

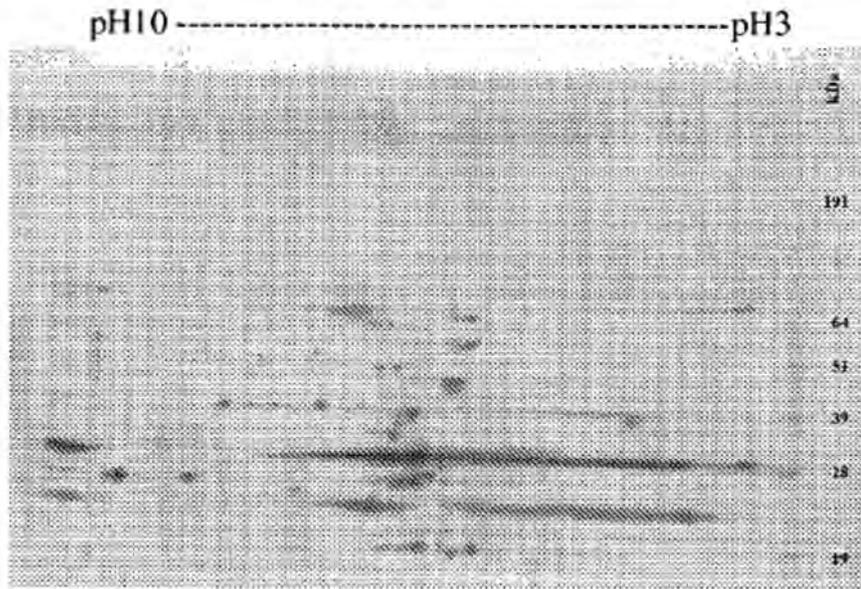


Figura 4

Análisis Western con mezcla de sueros infectados
de 3 perros positivos — 1:1.000

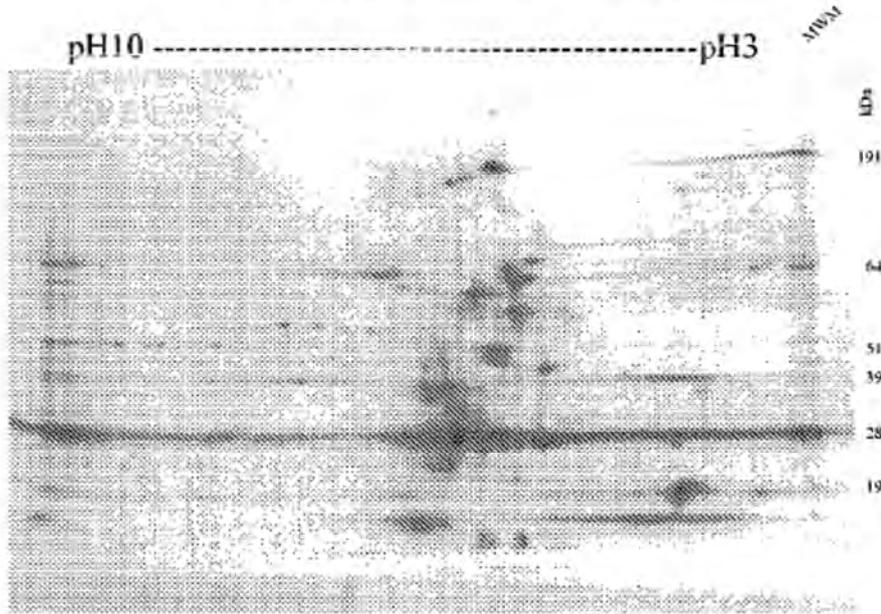


Figura 5

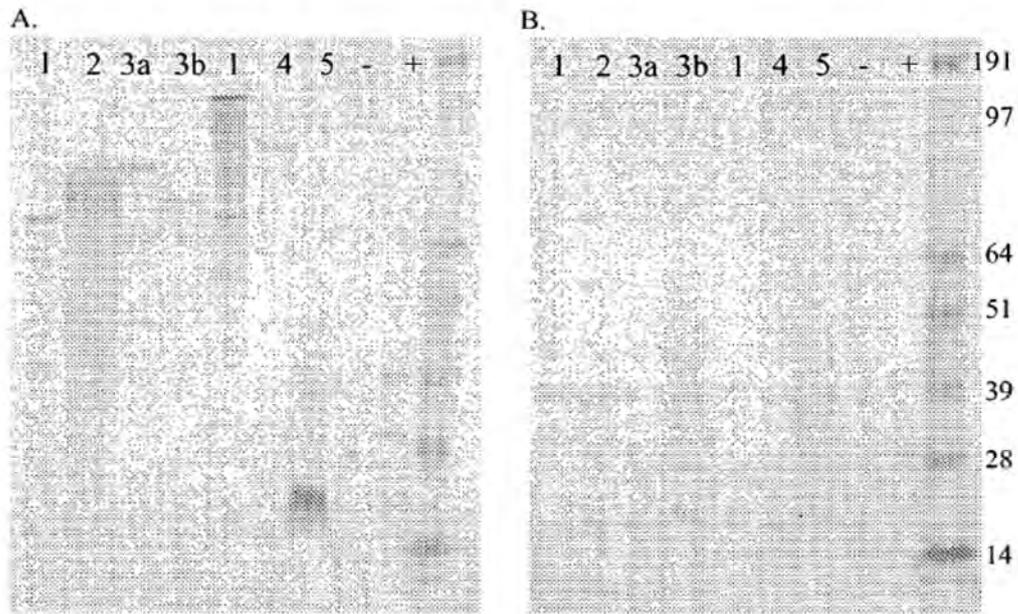


Figura 6

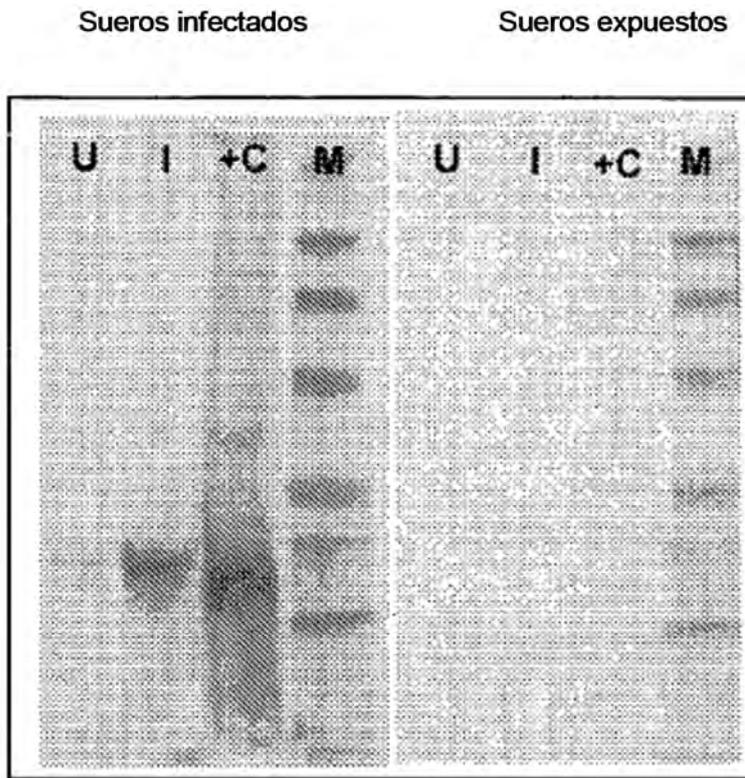


Figura 7