

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 715 280**

51 Int. Cl.:

C07K 14/29 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

A61K 39/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2006 E 10185583 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.12.2018 EP 2439210**

54 Título: **DIVA de Erlichia canis (Diferenciación entre Animales Vacunados e Infectados)**

30 Prioridad:

04.04.2005 US 668205 P

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

03.06.2019

73 Titular/es:

IDEXX LABORATORIES, INC. (100.0%)

**One IDEXX Drive
Westbrook, Maine 04092, US**

72 Inventor/es:

**KRAH III, EUGENE REGIS y
BEALL, MELISSA**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 715 280 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

DIVA de *Ehrlichia canis* (Diferenciación entre Animales Vacunados e Infectados)

La presente invención se refiere a métodos para determinar el estado de vacunación o infección de un animal para *Ehrlichia canis*, comprendiendo dichos métodos las etapas de poner en contacto una muestra biológica del animal con un reactivo que comprende uno o más primeros polipéptidos purificados de *E. canis* que comprenden las SEQ ID NOs: 2, 16, 17, o combinaciones de los mismos, y detectar si uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* se unen específicamente a un anticuerpo en la muestra biológica.

Los *Ehrlichia* son patógenos intracelulares obligados que infectan los glóbulos blancos circulantes en anfitriones mamíferos. *Ehrlichia canis* puede infectar cánidos y seres humanos y causar ehrlichiosis monocítica canina (EMC) y 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, dolor de cabeza, mialgia, y leucopenia. La detección y el tratamiento tempranos son importantes para el tratamiento de la ehrlichiosis tanto canina como humana.

En este contexto, el documento WO 00/12688 A1 describe la proteína p120 de *E. canis*, así como sus propiedades inmunogénicas en perros. Además, Yu *et al.* (Yu, X.-J. et al., Journal of Clinical Microbiology, 38(1); 2000; pp. 369-374) describe la proteína p120 de *E. canis* y su uso para el serodiagnóstico de la ehrlichiosis canina.

La presente invención se refiere a los siguientes ítems:

1. Un método para determinar el estado de vacunación o infección de un animal para *Ehrlichia canis*, comprendiendo el método:

(a) poner en contacto una muestra biológica del animal con un reactivo que comprende uno o más primeros polipéptidos purificados de *E. canis* que comprenden las SEQ ID NOs: 2, 16, 17, o combinaciones de los mismos; y

(b) detectar si uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* se unen específicamente a un anticuerpo en la muestra biológica;

en donde si uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* se unen específicamente a un anticuerpo de la muestra, en ese caso el animal está infectado con *E. canis* y, si uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* no se unen específicamente a un anticuerpo en la muestra, en ese caso el animal no está infectado con *E. canis* o ha sido vacunado con una vacuna que no comprende uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis*.

2. El método del ítem 1, en donde la vacuna de *E. canis* comprende al menos un polipéptido de *E. canis* p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8, p28-9, proA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa, p43, p153, o una combinación de los mismos, o un vector que codifica al menos un polipéptido de *E. canis* p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8, p28-9, proA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa, p43, p153, o una combinación de los mismos.

3. El método del ítem 1 o ítem 2, que comprende además la etapa de detectar si un anticuerpo en la muestra se une específicamente a un segundo polipéptido purificado de *E. canis* que se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria del animal a la vacuna de *E. canis*, determinando de este modo si el animal ha sido vacunado, en donde el segundo polipéptido purificado de *E. canis* es un polipéptido de *E. canis* p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8, p28-9, proA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa, p43, p153, o una combinación de los mismos.

4. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 3, en donde uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* se inmovilizan en un soporte sólido.

5. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 4, en donde uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* están en una forma multimérica.

6. El método de uno cualquiera de los ítems 1 a 5, en donde uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* están unidos a una proteína recombinante, un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un conector de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos.

7. El método de uno cualquiera de los ítems 3 a 6, en donde el segundo polipéptido purificado de *E. canis* está inmovilizado en un soporte sólido.

8. El método de uno cualquiera de los ítems 3 a 7, en donde el segundo polipéptido purificado de *E. canis* está en una forma multimérica.

9. El método de uno cualquiera de los ítems 3 a 8, en donde el segundo polipéptido purificado de *E. canis* está unido a una proteína recombinante, un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un conector de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio de membrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos.

5 Las figuras muestran:

La Figura 1 muestra la evaluación de SNAP®3Dx® Assay de perros beagle de laboratorio. El dispositivo de SNAP® se utilizó como describe el fabricante. La muestra "Pre" es desde el día 0. La muestra "Post" es desde el día 42. La aplicación positiva para *E. canis* fue positiva en los 4 perros para la muestra del día 42. Se observaron resultados similares para la muestra del día 70.

10 La Figura 2 muestra un gel de proteínas de *E. canis* separadas mediante electroforesis en gel 2D. Teñido con Azul de Coomassie BIOSAFE™ (Bio-Rad Inc.).

La Figura 3 muestra una transferencia Western de proteínas de *E. canis* utilizando sueros de perro cosechados el día 0. La dilución del plasma es 1:100. Estos perros fueron negativos para la reactividad con antígenos de *E. canis*.

15 La Figura 4 muestra una transferencia Western de proteínas de *E. canis* utilizando sueros de perro de una reserva de cuatro animales sensibilizados. La dilución de los sueros es 1:100.

La Figura 5 muestra una transferencia Western de proteínas de *E. canis* utilizando plasma de perro de una reserva de animales infectados. La dilución de los sueros es 1:1.000.

20 La Figura 6 muestra una transferencia Western de seis diferentes antígenos DIVA de *E. canis* expresados en *E. coli* y sondeados con cualquier suero de perro de una reserva de cuatro animales infectados (A) o sueros de perro reunidos de cuatro animales sensibilizados (B). Las diluciones de suero fueron de 1:100 para los animales sensibilizados o de 1:500 para los animales infectados. Los antígenos DIVA representados incluyen: (1) el antígeno de 200 kDa, (2) la proteína ribosomal L1, (3a y 3b) "ATPasa" - dos segmentos diferentes, (4) el antígeno de 120 kDa, (5) Proteínas de choque térmico/antígeno p16.

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

La Figura 8 muestra la secuencia repetida en la SEQ ID NO: 15.

La Figura 9A muestra la SEQ ID NO: 16.

30 La Figura 9B muestra la SEQ ID NO: 17.

Se describen los antígenos de *Ehrlichia canis* que se pueden utilizar para diferenciar animales infectados naturalmente por *E. canis* de animales que han sido sensibilizados con *E. canis*, *p. ej.*, vacunados frente a *E. canis*.

35 Antes de describir la presente invención en detalle, se definirán una serie de términos. Según se utilizan en la presente memoria, las formas singulares "un", "uno", "una" y "el" y "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

40 Según se utiliza en la presente memoria, el término "polipéptido" se refiere a un compuesto de una sola cadena o un complejo de dos o más cadenas de residuos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. La cadena o las cadenas pueden tener cualquier longitud y pueden comprender una proteína de fusión. Aunque "proteína" se utiliza 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 solapa y varía. El término "polipéptido" según se utiliza en la presente memoria se refiere de ese modo indistintamente 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.

45 Según se utiliza en la presente memoria, "antígeno" como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula contra la que un sujeto puede iniciar una respuesta inmunitaria humoral y/o celular. Los antígenos pueden ser cualquier tipo de molécula biológica, incluyendo, por ejemplo, metabolitos intermedios simples, azúcares, lípidos, y hormonas, así como macromoléculas tales como carbohidratos complejos, fosfolípidos, ácidos nucleicos y proteínas. En las composiciones y métodos descritos en la presente memoria, se prefiere que, el antígeno sea un polipéptido, *p. ej.*, uno que comprende al menos aproximadamente seis o más aminoácidos.

50 Según se utiliza en la presente memoria, un "derivado" de un polipéptido antigénico de *E. canis*, o un antígeno o polipéptido que "deriva de" un antígeno o polipéptido de *E. canis*, se refiere a un antígeno o polipéptido en el que la forma nativa ha sido purificada, modificada o alterada. Tales modificaciones incluyen, pero no se limitan a: 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 dar como resultado cambios en la estructura primaria, secundaria o terciaria.

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

Una "infección", tal como en una infección por *E. canis*, significa que un 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*, tales como la transmisión por garrapatas. Una infección no incluye una exposición a *E. canis* mediante la vacunación.

Un "polipéptido o antígeno que no es un elemento de una vacuna de *E. canis*" es cualquier polipéptido o antígeno de *E. canis* que no está presente en, o no es una porción inmunogénicamente activa de una o varias vacunas de *E. canis* concretas. Los elementos de la vacuna o las vacunas pueden ser porciones de una vacuna de subunidades que incluye menos que toda la bacteria; estas porciones se pueden sintetizar químicamente o se pueden expresar de manera recombinante antes de convertirse en parte de la vacuna, y estas porciones pueden estar codificadas por uno o más vectores que expresan una composición inmunogénica *in vivo*.

Un "anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna de *E. canis*" se refiere a un anticuerpo que se obtiene como resultado de una vacunación con una vacuna de *E. canis*. Estos anticuerpos pueden ser idénticos o similares a los anticuerpos obtenidos como resultado de una infección por *E. canis* natural. Estos anticuerpos se mantendrán a un título suficiente y con el fin de proporcionar un efecto protector y neutralizador contra la bacteria. Una vacunación satisfactoria produce un nivel medible del anticuerpo (o anticuerpos) que es obtenido por un componente de la vacuna de *E. canis*. Los ejemplos de los antígenos de *E. canis* que provocan anticuerpos que pueden ser un componente de la respuesta inmunitaria de un animal a una vacuna de *E. canis* son p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8, p28-9 (véanse las Patentes de los Estados Unidos Núms. 6660269; 6.458.942; 6.403.780; 6.392.023), ProA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa (véase la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 20040170972), p43 (véase la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.355.777), que es la porción N-terminal de p153, una glicoproteína (véase la Publicación de la Patente de los Estados Unidos 2004/0121433), y p153.

Una respuesta inmunitaria consiste en el desarrollo en un organismo de una respuesta inmunitaria mediada por células y/o anticuerpos a un antígeno tal como un polipéptido. Por lo general, dicha respuesta incluye, pero no se limita a uno o más de los siguientes: producción de anticuerpos, células B, células T coadyuvantes, células T supresoras, y/o células T citotóxicas. Una respuesta inmunitaria se puede detectar utilizando cualquiera de los diversos análisis conocidos por los expertos en la técnica.

Polipéptidos

Las muestras biológicas de los animales que han sido vacunados contra la *E. canis* tienen el potencial de producir un resultado positivo en una prueba para infección por *E. canis* debido a la presencia de anticuerpos producidos en respuesta a la vacuna. En un aspecto, en la presente memoria se describe un método para distinguir entre los animales que han sido infectados con *E. canis*, animales que no han sido infectados con *E. canis* y animales que han sido vacunados contra *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 de *E. canis* concreta.

El desarrollo de anticuerpos contra *E. canis* en un animal frente a una vacuna depende de la vacuna concreta utilizada para vacunar al animal. La diferencia en la respuesta inmunitaria entre los animales que se vacunan contra *E. canis* y los animales que están naturalmente o experimentalmente infectados con *E. canis* proporciona un medio para determinar si un animal ha sido vacunado o si está infectado de forma natural o experimentalmente. Por lo tanto, utilizando los métodos descritos en la presente memoria, los animales que han sido infectados con *E. canis* se pueden distinguir de los animales que no han sido infectados con *E. canis* o de los que han sido vacunados contra la *E. canis*. Los antígenos descritos en la presente memoria, sus regiones inmunodominantes y epítopos se pueden utilizar en los métodos descritos en la presente memoria. Estas composiciones pueden ser referidas como antígenos DIVA (Diferenciación entre Animales Vacunados e Infectados) de *E. canis*. Un antígeno DIVA de *E. canis* induce una respuesta inmunitaria, p. ej., la producción de anticuerpos específicos, en un animal que es diferente de la respuesta inmunitaria inducida en el animal por una vacuna de *E. canis* concreta.

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 inmunitaria de un animal a una vacuna concreta puede indicar una infección natural. La ausencia de tal unión puede indicar vacunación o ausencia de infección. Además, un segundo antígeno, separado, tal como un antígeno de *E. canis* que se une específicamente a un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria del animal a una vacuna de *E. canis* concreta, 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 tales, varias combinaciones de reactivos de captura separados pueden conducir a una determinación de la vacunación y/o el estado de infección del sujeto de ensayo.

En un aspecto, un método descrito en la presente memoria incluye poner en contacto una muestra biológica de un animal con un antígeno que es una parte de la bacteria *E. canis* nativa, pero no es un elemento de una vacuna de *E. canis* concreta. Un animal es cualquier mamífero que es probable que esté vacunado contra *E. canis* y, en particular, cánidos. Además, los seres humanos pueden ser vacunados contra *E. canis*. En otro aspecto, se describe un método en la presente memoria para determinar si un animal no ha sido infectado por *E. canis* y no ha sido vacunado contra *E. canis*. Una muestra biológica de un animal se analiza para detectar la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. canis*, y la presencia o ausencia de anticuerpos específicos para una vacuna de *E. canis* concreta. Después se determina que el animal no ha sido infectado y no ha sido vacunado mediante la determinación de la ausencia de tales anticuerpos.

En un aspecto descrito en la presente memoria, un antígeno DIVA no es un elemento de una vacuna de *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 utilizados 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 DIVA, se puede determinar que el animal ha sido vacunado. Si no se detecta unión a ningún antígeno, se puede determinar que el animal no está infectado y no está vacunado.

Un polipéptido descrito en la presente memoria puede ser modificado después de la traducción. Un polipéptido purificado es una preparación de polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, otros tipos de polipéptidos, precursores químicos, productos químicos utilizados en la síntesis del polipéptido, o combinaciones de los mismos. Una preparación de polipéptido que está sustancialmente libre de material celular, medio de cultivo, precursores químicos, productos químicos utilizados 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 utilizados en la síntesis. Por lo tanto, un polipéptido purificado es aproximadamente 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más puro.

Los polipéptidos purificados descritos en la presente memoria pueden ser polipéptidos completos o fragmentos de polipéptidos. Por ejemplo, los fragmentos de polipéptidos descritos en la presente memoria pueden comprender aproximadamente 6, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 250, 500, 750 aminoácidos contiguos o más de los polipéptidos descritos en la presente memoria. Los ejemplos de polipéptidos descritos en la presente memoria incluyen los que se muestran en las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, o 17. Los polipéptidos variantes son idénticos al menos aproximadamente en 80, o idénticos en aproximadamente 90, 96, 98, o 99% a las secuencias de polipéptidos mostradas en las SEQ ID NOS: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, o 17 y también son polipéptidos descritos en la presente memoria. Los polipéptidos variantes tienen una o más variaciones de aminoácidos conservativas u otras modificaciones menores y retienen la actividad biológica, es decir, son equivalentes biológicamente funcionales. Un equivalente biológicamente activo tiene la función sustancialmente equivalente en comparación con el correspondiente polipéptido de tipo salvaje.

El porcentaje de identidad de secuencia tiene un significado reconocido en la técnica y hay numerosos métodos para medir la identidad entre dos secuencias de polipéptidos o polinucleótidos. Véase, p. ej., Lesk, Ed., Computational Molecular Biology, Oxford University Press, Nueva York, (1988); Smith, Ed, Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Academic Press, Nueva York, (1993); Griffin & Griffin, Eds., Computer Analysis of Sequence Data, Parte I, Humana Press, Nueva Jersey, (1994); von Heinje, Sequence Analysis In Molecular Biology, Academic Press, (1987); y Gribskov & Devereux, Eds., Sequence Analysis Primer, M Stockton Press, Nueva York, (1991). Los métodos para el alineamiento de polinucleótidos o polipéptidos están codificados en programas informáticos, incluyendo 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, Versión 8 para Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Madison, WI 53711) que utiliza el algoritmo de homología local de Smith y Waterman (Adv. App. Math, 2:482-489 (1981)). Por ejemplo, el programa informático ALIGN que emplea el algoritmo FASTA se puede utilizar, con una búsqueda de huecos afines con una penalización de hueco abierto de -12 y una penalización de extensión de hueco de -2.

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

Las variantes generalmente se pueden identificar modificando una de las secuencias de polipéptidos descritos en la presente memoria, y evaluando 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 descrito en la presente memoria en un análisis tal como un análisis inmunohistoquímico, un análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), un radioinmunoanálisis (RIA), un análisis inmunoenzimático o un análisis de transferencia

western, *p. ej.*, tiene 90-110% de la actividad del polipéptido original. En una realización, el análisis es un análisis de competición en donde el polipéptido biológicamente equivalente es capaz de reducir la unión del polipéptido descrito en la presente memoria a un antígeno o anticuerpo reactivo correspondiente en aproximadamente 80, 95, 99, o 100%. Un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de tipo salvaje correspondiente también se une específicamente al polipéptido variante. Los polipéptidos variantes descritos en la presente memoria pueden comprender aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, o 6 sustituciones de aminoácidos conservativas.

Una sustitución conservativa es una en la que se sustituye un aminoácido por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de tal manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido siguieran sustancialmente inalteradas. En general, los siguientes grupos de aminoácidos representan cambios conservativos: (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 descrito en la presente memoria puede comprender adicionalmente una secuencia señal (o líder) que dirige co-traduccionalmente o post-traduccionalmente la transferencia de la proteína. El polipéptido también puede comprender un conector u otra secuencia para facilitar la síntesis, la purificación o la identificación del polipéptido (*p. ej.*, poli-His), o para mejorar la unión del polipéptido a un soporte sólido. Por ejemplo, un polipéptido se puede conjugar con una región Fc de inmunoglobulina o albúmina de suero bovino.

Un polipéptido puede estar conectado covalentemente o no covalentemente a una secuencia de aminoácidos a la que el polipéptido no está normalmente asociada en la naturaleza. Además, un polipéptido puede estar conectado covalentemente o no covalentemente a compuestos o moléculas distintas de aminoácidos. Por ejemplo, un polipéptido puede estar conectado a un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un conector de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteína, o una combinación de los mismos. En una realización descrita en la presente memoria, un ligando de purificación de proteína puede ser uno o más residuos de aminoácidos C en, por ejemplo, el extremo amino o el extremo carboxi de un polipéptido descrito en la presente memoria. Un espaciador de aminoácidos es una secuencia de aminoácidos que normalmente no se asocian con un polipéptido descrito en la presente memoria en la naturaleza. Un espaciador de aminoácidos puede comprender aproximadamente 1, 5, 10, 20, 100, o 1.000 aminoácidos.

Si se desea, un polipéptido puede ser una proteína de fusión, que también puede contener otras secuencias de aminoácidos, tales como conectores de aminoácidos, espaciadores de aminoácidos, secuencias señal, secuencias de transferencia de parada TMR, dominios transmembrana, así como ligandos útiles en la purificación de proteínas, tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina, y proteína A estafilocócica, o combinaciones de los mismos. En una proteína de fusión puede estar presente más de un polipéptido descrito en la presente memoria. Los fragmentos de polipéptidos descritos en la presente memoria pueden estar presentes en una proteína de fusión descrita en la presente memoria. Una proteína de fusión descrita en la presente memoria puede comprender uno o más polipéptidos que se muestran en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, o 17., o fragmentos de los mismos, o combinaciones de los mismos.

Los polipéptidos descritos en la presente memoria pueden estar en una forma multimérica. Es decir, un polipéptido puede comprender una o más copias de las SEQ ID NOs: NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17 o una combinación de las mismas. Un polipéptido multimérico puede ser un péptido antigénico múltiple (MAP). Véase *p. ej.*, Tam, J. Immunol. Methods, 196: 17-32 (1996).

Los polipéptidos descritos en la presente memoria 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 antigénicos). Un epítomo puede ser un epítomo lineal, un epítomo secuencial o un epítomo conformacional. Los epítomos dentro de un polipéptido descrito en la presente memoria pueden ser identificados por medio de varios métodos. Véase, *p. ej.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.554.101; Jameson y Wolf, CABIOS 4: 181-186 (1988). Por ejemplo, un polipéptido descrito en la presente memoria puede ser aislado y escrutado. Se puede preparar por medio de escisión proteolítica una serie de péptidos cortos, que juntos abarcan una secuencia de polipéptido completa. Comenzando por ejemplo, con fragmentos de polipéptido de 100 unidades, cada fragmento se puede someter a ensayo para determinar la presencia de epítomos reconocidos en un ELISA. Por ejemplo, en un análisis ELISA un polipéptido de *E. canis*, tal como un fragmento polipeptídico de 100 unidades, está anclado 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 que se una al antígeno no marcado, en condiciones en las que se bloquea la absorción no específica, y cualquier anticuerpo no unido y otras proteínas se lavan. La unión del anticuerpo se detecta, por ejemplo, por medio de una reacción que convierte un sustrato incoloro en un producto de reacción coloreado. Después se pueden someter a ensayo fragmentos progresivamente más pequeños y solapantes, a partir de un oligómero de 100 unidades identificado para mapear el epítomo de interés.

En una realización descrita en la presente memoria, un antígeno DIVA comprende un epítomo o región inmunodominante. Es decir, un epítomo o región que induce y se une con mayor frecuencia a anticuerpos en una población de los mismos cuando se compara con otros epítomos. Un antígeno puede tener uno o más epítomos inmunodominantes. Los epítomos inmunodominantes se pueden mapear, por ejemplo, sobre un polipéptido después

de que el polipéptido se haya administrado a un animal o antes de semejante administración. Véase p. ej., la Publicación de Patente de los Estados Unidos Núm. 2004/0209324.

Un polipéptido descrito en la presente memoria se puede producir de forma recombinante. Un polinucleótido que codifica un polipéptido descrito en la presente memoria se puede introducir en un vector de expresión recombinante, que se puede expresar en un sistema de células anfitrionas de expresión adecuado utilizando mecanismos bien conocidos en la técnica. Se encuentra disponible en la técnica una variedad de sistemas de expresión de bacterias, levaduras, plantas, mamíferos, e insectos y se puede utilizar cualquiera de tales sistemas 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 descrito en la presente memoria puede comprender una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, o 17. Un polipéptido inmunogénico puede inducir anticuerpos u otras respuestas inmunitarias (p. ej., respuestas de las células T del sistema inmunitario) que reconocen epítomos de polipéptidos que tienen las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, o 17. Un polipéptido inmunogénico descrito en la presente memoria también puede ser un fragmento de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17. Un fragmento de un polipéptido inmunogénico descrito en la presente memoria puede tener 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 medio de cualquier método conocido en la técnica. Los métodos más simples son generalmente los métodos de inmunoanálisis. Uno de tales métodos es un método basado en la competición en el que las muestras de suero se incuban previamente con un antígeno de *E. canis* que no es un elemento de una vacuna de *E. canis* (p. ej., un antígeno DIVA de *E. canis*), y después se añaden a una fase sólida, tal como una 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 impedirán que el antígeno DIVA de *E. canis* se una 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 al antígeno de *E. canis*, ya sea directamente marcado ya sea susceptible de convertirse en marcado por medio de la unión a otro compañero de unión que tenga una marca. Una muestra positiva, es decir una muestra que tenga anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. canis* se asocia con una disminución de la señal desde la marca.

En una realización concreta, los anticuerpos para un antígeno DIVA de *E. canis* en una muestra biológica se pueden detectar poniendo en contacto la muestra con un antígeno DIVA de *E. canis* y añadiendo 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 de burro anti-conejo conjugado con HRP. Los anticuerpos de la muestra evitarán la unión del antígeno DIVA al anticuerpo inmovilizado, causando de ese modo una disminución de la señal.

Otro método para la detección de anticuerpos específicos para un antígeno DIVA de *E. canis* es un análisis sándwich, donde una muestra biológica sospechosa de contener un anticuerpo específico para un antígeno DIVA de *E. canis* se pone en contacto con un antígeno DIVA inmovilizado de *E. canis* para formar un complejo inmunológico. La presencia de un anticuerpo específico para un antígeno DIVA de *E. canis* se determina mediante 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 descrito en la presente memoria, los antígenos DIVA de *E. canis* se pueden inmovilizar sobre un soporte sólido adecuado. Una muestra biológica se pone en contacto con el antígeno DIVA de *E. canis*, al que se unen los anticuerpos anti-*E. canis*, si dichos anticuerpos están presentes en la muestra. La unión puede ser detectada por cualquier medio adecuado, p. ej., enzimas, radionúclidos, partículas o marcas fluorescentes. En una 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 anticuerpos anti-*E. canis* (si están presentes). En una realización concreta, los anticuerpos contra *E. canis* pueden ser detectados mediante la inmovilización de un antígeno de *E. canis* sobre 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, se puede lograr la unión de los anticuerpos contra *E. canis* al antígeno, por ejemplo, con un anticuerpo IgG marcado.

Los antígenos DIVA descritos en la presente memoria también pueden comprender mimótopos de antígenos DIVA descritos en la presente memoria. Un mimótopo es un epítipo peptídico aleatorio que imita un epítipo antigénico natural durante la presentación del epítipo. Los epítomos peptídicos aleatorios pueden ser identificados generando o seleccionando una biblioteca de epítomos peptídicos aleatorios. La biblioteca se pone en contacto con un anticuerpo. Se identifican los mimótopos que son específicamente inmunorreactivos con el anticuerpo. Las bibliotecas de péptidos aleatorios pueden presentarse, por ejemplo, en fagos o generarse en forma de bibliotecas combinatorias.

Los antígenos DIVA de *E. canis*, p. ej., polipéptidos, pueden ser naturales, es decir, aislados de una fuente natural, o pueden ser sintéticos (es decir, sintetizados químicamente o producidos de forma recombinante utilizando técnicas

de ingeniería genética). Las proteínas naturales pueden ser aisladas de todas las bacterias por medio de técnicas convencionales, tales como la cromatografía de afinidad. Los anticuerpos policlonales o monoclonales se pueden utilizar para preparar una columna de afinidad adecuada por medio de técnicas bien conocidas.

Las proteínas que presentan reacciones cruzadas inmunológicas con una proteína de *E. Canis* natural pueden sintetizarse químicamente. Por ejemplo, se pueden sintetizar polipéptidos que tienen menos de aproximadamente 100 aminoácidos, más habitualmente menos de aproximadamente 80 aminoácidos, y típicamente menos de aproximadamente 50 aminoácidos, por el método de síntesis en fase sólida conocido de Merrifield en el que se añaden secuencialmente aminoácidos a una cadena en crecimiento (Merrifield, 1963, J. Am. Chem. Soc, 85: 2149-2156). También se pueden utilizar proteínas recombinantes. Estas proteínas pueden ser producidas mediante la expresión en células cultivadas de moléculas de ADN recombinante que codifican una parte deseada del genoma de *E. canis*. La parte del genoma de *E. canis* puede ser natural o sintética, con genes naturales obtenibles a partir de la bacteria aislada por medio de técnicas convencionales.

Polinucleótidos de *E. canis*

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria contienen menos de un genoma microbiano completo y pueden ser ácidos nucleicos de hebra sencilla o de doble hebra. Un polinucleótido puede ser ARN, ADN, ADNc, ADN genómico, ARN o ADN sintetizado químicamente o combinaciones de los mismos. Los polinucleótidos se pueden purificar libres de otros componentes, tales como proteínas, lípidos y otros polinucleótidos. Por ejemplo, el polinucleótido puede ser purificado en 50%, 75%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100%. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria codifican los polipéptidos descritos anteriormente. En una realización descrita en la presente memoria, los polinucleótidos codifican polipéptidos que se muestran en las SEQ ID : NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17 o combinaciones de los mismos. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria incluyen los que se muestran en las SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, o combinaciones de los mismos. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden comprender otras secuencias de nucleótidos, tales como secuencias que codifican conectores, secuencias señal, secuencias de transferencia de parada TMR, dominios transmembrana, o ligandos útiles en la purificación de proteínas tales como glutatión-S-transferasa, etiqueta de histidina, y proteína A estafilocócica.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden ser aislados. Un polinucleótido aislado es un polinucleótido que no es inmediatamente contiguo a una o ambas de las secuencias genómicas limítrofes 5' y 3' con las que está naturalmente asociado. Un polinucleótido aislado puede ser, por ejemplo, una molécula de ADN recombinante de cualquier longitud, siempre que las secuencias de ácido nucleico encontradas de forma natural que flanquean inmediatamente la molécula de ADN recombinante en un genoma de origen natural se elimine o esté ausente. Los polinucleótidos aislados incluyen también moléculas de ácido nucleico de origen no natural. Una molécula de ácido nucleico existente entre los cientos a millones de otras moléculas de ácido nucleico dentro de, por ejemplo, bibliotecas de ADNc o genómicas, o cortes de gel que contienen un producto digerido con enzimas de restricción de ADN genómico no debe ser considerada un polinucleótido aislado. La secuencia de nucleótidos completa para *E. canis* se encuentra disponible, *por ejemplo*, en el número de acceso GenBank NCBI: NZ_AAEJ01000001.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria también pueden comprender fragmentos que codifican polipéptidos inmunogénicos. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden codificar polipéptidos completos, fragmentos de polipéptidos y polipéptidos variantes o de fusión.

Las secuencias de nucleótidos degenerados que codifican los polipéptidos descritos en la presente memoria, así como las secuencias de nucleótidos homólogas que son idénticas al menos aproximadamente en 80, o aproximadamente en 90, 96, 98, o 99% a las secuencias de polinucleótidos descritos en la presente memoria y los complementos de las mismas también se describen en la presente memoria. El porcentaje de identidad de secuencia se puede calcular como se describe en la sección "Polipéptidos". Las secuencias de nucleótidos degenerados son polinucleótidos que codifican un polipéptido descrito en la presente memoria o fragmentos de los mismos, pero difieren en la secuencia de ácido nucleico a partir de la secuencia de polinucleótidos de tipo salvaje, debido a la degeneración del código genético. Las moléculas de ADN complementario (ADNc), homólogos de especie, y variantes de polinucleótidos de *E. canis* que codifican polipéptidos de *E. canis* biológicamente funcionales también son polinucleótidos de *E. canis*. Los polinucleótidos descritos en la presente memoria se pueden aislar a partir de secuencias de ácido nucleico presentes, por ejemplo, en 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. Se puede utilizar un método de amplificación tal como la PCR para amplificar polinucleótidos de cualquier ADN genómico o ADNc que codifique los polipéptidos.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden comprender secuencias codificantes para los polipéptidos de origen natural o pueden codificar secuencias alteradas que no existen en la naturaleza. Si se desea, los polinucleótidos se pueden clonar en un vector de expresión que comprende elementos de control de la expresión, incluyendo por ejemplo, orígenes de replicación, promotores, intensificadores, u otros elementos reguladores que dirigen la expresión de los polinucleótidos descritos en la presente memoria en células anfitrionas. 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 de Tipo 2 o un vector de Tipo 5. Opcionalmente, se pueden utilizar otros vectores, incluyendo pero no limitados a virus Sindbis, virus de simios 40, vectores de alfavirus, vectores de poxvirus, y citomegalovirus y vectores retrovirales, tales como virus de sarcoma murino, virus del tumor mamario de ratón, virus de la leucemia murina de Moloney, y virus del sarcoma de Rous. También se pueden utilizar minicromosomas tales como MC y MC1, bacteriófagos, fagémidos, cromosomas artificiales de levadura, cromosomas artificiales bacterianos, partículas de virus, partículas similares a virus, cósmidos (plásmidos en los que se han insertado sitios cos del fago lambda) y replicones (elementos genéticos que son susceptibles de replicación bajo su propio control en una célula).

Los métodos para preparar polinucleótidos conectados operablemente a una secuencia de control de la expresión y expresarlos en una célula anfitriona son bien conocidos en la técnica. Véase, *p. ej.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.366.246. Un polinucleótido descrito en la presente memoria está conectado operablemente cuando está colocado adyacente a o cerca de uno o más elementos de control de la expresión, que dirigen la transcripción y/o la traducción del polinucleótido.

Los polinucleótidos descritos en la presente memoria se pueden utilizar, por ejemplo, como sondas o cebadores, por ejemplo cebadores de PCR, para detectar la presencia de polinucleótidos de *E. canis* en una muestra, tal como una muestra biológica. La capacidad de tales sondas y cebadores para hibridar específicamente con 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 los cebadores de polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden hibridar con las secuencias complementarias en una muestra tal como una muestra biológica, incluyendo saliva, esputo, sangre, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado de heridas, o tejido. Los polinucleótidos de la muestra pueden ser, por ejemplo, sometidos a electroforesis en gel u otras técnicas de separación por tamaño o puede ser inmovilizados sin separación por tamaños. Las sondas o cebadores de polinucleótidos pueden estar marcados. Las marcas adecuadas, y los métodos para marcar sondas y cebadores son conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, marcas radiactivas incorporadas por medio de traslado de muescas o por medio de quinasas, marcas de biotina, marcas fluorescentes, marcas quimioluminiscentes, marcas bioluminiscentes, marcas de quelantes metálicos y marcas enzimáticas. Los polinucleótidos de la muestra se ponen en contacto con las sondas o los cebadores en condiciones de hibridación de restricción adecuada.

Dependiendo de la aplicación, se pueden utilizar condiciones variables de hibridación para conseguir grados variables de selectividad de la sonda o el cebador hacia la secuencia diana. Para aplicaciones que requieren una alta selectividad, se pueden utilizar condiciones relativamente restrictivas, tales como condiciones de baja concentración de sal y/o alta temperatura, tales como las proporcionadas por una concentración de sal de aproximadamente 0,02 M a aproximadamente 0,15 M a temperaturas de aproximadamente 50°C a aproximadamente 70°C. Para aplicaciones que requieren menos selectividad, se pueden utilizar condiciones de hibridación menos restrictivas. Por ejemplo, condiciones de concentración de sal de aproximadamente 0,14 M a aproximadamente 0,9 M, a temperaturas que varían desde aproximadamente 20°C a aproximadamente 55°C. La presencia de un complejo hibridado que comprende la sonda o el cebador y un polinucleótido complementario de la muestra de ensayo indica la presencia de *E. canis* o una secuencia de polinucleótidos de *E. canis* en la muestra.

Anticuerpos

Los anticuerpos descritos en la presente memoria son moléculas de anticuerpo que se unen específicamente y de forma estable a un polipéptido de *E. canis* descrito en la presente memoria o a un fragmento del mismo. Un anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo de cadena sencilla (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, en donde la porción está libre de los dominios constantes de la cadena pesada de la región Fc del anticuerpo intacto. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpos incluyen los fragmentos Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂ y F_v.

Un anticuerpo descrito en la presente memoria puede ser cualquier clase de anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Un anticuerpo o fragmento del mismo se une a un epítipo de un polipéptido descrito en la presente memoria. Un anticuerpo se puede elaborar in vivo en animales de laboratorio adecuados o in vitro utilizando técnicas de ADN recombinante. Los medios para preparar y caracterizar anticuerpos son bien conocidos en la técnica. Véanse, *p. ej.*, 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. *Methods 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 descrito en la presente memoria a un animal, tal como un ser humano u otro primate, ratón, rata, conejo, cobaya, cabra, cerdo, perro, vaca, oveja, burro, o un caballo. El suero del animal inmunizado se recoge y se purifican los anticuerpos del plasma mediante, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, seguido de cromatografía, tal como cromatografía de afinidad. Los mecanismos para producir y procesar anticuerpos policlonales son conocidos en la técnica.

"Se une específicamente" o "específico para" significa que un antígeno, *p. ej.*, un polipéptido, reconoce y se une a un

anticuerpo descrito en la presente memoria con mayor afinidad que a otras moléculas, no específicas. Por ejemplo, un anticuerpo generado contra un antígeno (*p. ej.*, un polipéptido) al que se une más eficazmente que a una proteína no específica puede describirse como de unión específica al antígeno. La unión específica se puede someter a ensayo usando, por ejemplo, un análisis inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA), un radioinmunoanálisis (RIA), o un análisis de transferencia de Western usando metodología bien conocida en la técnica.

Adicionalmente, los anticuerpos monoclonales dirigidos contra epítomos presentes sobre un antígeno, *p. ej.*, un polipéptido descrito en la presente memoria, también se pueden producir fácilmente. Por ejemplo, las células B normales de un mamífero, tal como un ratón, que fue inmunizado con un polipéptido descrito en la presente memoria se pueden fusionar con, por ejemplo, células de mieloma de ratón sensibles a HAT para producir hibridomas. Los hibridomas que producen anticuerpos específicos de *E. canis* se pueden identificar utilizando RIA o ELISA y aislar por medio de clonación en agar semi-sólido o por dilución limitante. Los clones que producen anticuerpos específicos de *E. canis* se aíslan mediante otra ronda de escrutinio. Los anticuerpos monoclonales pueden ser escrutados para determinar la especificidad usando técnicas convencionales, por ejemplo, mediante la unión de un polipéptido descrito en la presente memoria a una placa de microtitulación y la medición de la unión del anticuerpo monoclonal mediante un análisis ELISA. Los mecanismos para producir y procesar anticuerpos monoclonales son conocidos en la técnica. Véase *p. ej.*, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). Se pueden preparar directamente isotipos concretos de un anticuerpo monoclonal, seleccionando 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 *sib* para aislar las variantes de cambio de clase. Véanse Steplewski et al., *P.N.A.S. U.S.A.* 82:8653 1985; Spria et al., *J. Immunolog. Meth.* 74:307, 1984. Los anticuerpos monoclonales descritos en la presente memoria también pueden ser anticuerpos monoclonales recombinantes. Véanse, *p. ej.* la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.474.893; la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.816.567. Los anticuerpos descritos en la presente memoria también pueden ser contruidos químicamente. Véase, *p. ej.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 4.676.980.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria pueden ser anticuerpos quiméricos (véase, *p. ej.*, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.482.856), humanizados (véanse, *p. ej.*, Jones et al., *Nature* 321: 522 (1986); Reichmann et al., *Nature* 332: 323 (1988); Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593 (1992)), o humanos. Los anticuerpos humanos se pueden elaborar, por ejemplo, mediante inmortalización directa, presentación en fagos, ratones transgénicos, o una metodología Trímera, véase *p. ej.*, Reisener et al., *Trends Biotechnol.* 16:242-246 (1998).

Los anticuerpos que se unen específicamente a antígenos de *E. canis* (*p. ej.*, polipéptidos de *E. canis* mostrados en las SEQ ID NOs: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17, 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 un humano o un perro. Un inmunoanálisis para *E. canis* o un antígeno de *E. canis* puede utilizar un anticuerpo o varios anticuerpos. Un inmunoanálisis para *E. canis* o un antígeno de *E. canis* puede utilizar, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal dirigido a un epítomo de *E. canis*, una combinación de anticuerpos monoclonales dirigidos a epítomos de un polipéptido de *E. canis*, anticuerpos monoclonales dirigidos a epítomos de diferentes polipéptidos de *E. canis*, anticuerpos policlonales dirigidos al mismo antígeno de *E. canis*, anticuerpos policlonales dirigidos a diferentes antígenos de *E. canis*, o una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales. Los protocolos de inmunoanálisis se pueden basar, por ejemplo, en análisis de competición, de reacción directa, o de tipo sándwich utilizando, por ejemplo, un anticuerpo marcado. Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden marcar con cualquier tipo de marca conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, marcas fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivas, enzimáticas, de metales coloidales, radioisotópicas y bioluminiscentes.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria o fragmentos de los mismos se pueden unir a un soporte y se pueden utilizar para detectar la presencia de *E. canis* o un antígeno de *E. canis*, *p. ej.*, un antígeno DIVA de *E. canis* o un antígeno no DIVA de *E. canis*. Los soportes incluyen, por ejemplo, vidrio, poliestireno, polipropileno, polietileno, dextrano, nailon, amilasas, celulosas naturales y modificadas, poliácridamidas, agarosas y magletita.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar adicionalmente para aislar organismos de *E. canis* o antígenos de *E. canis* por medio de columnas de inmunoafinidad. Los anticuerpos se pueden fijar a un soporte sólido mediante, por ejemplo, adsorción o por medio de enlaces covalentes de modo que los anticuerpos conservan su actividad inmunoselectiva. Opcionalmente, se pueden incluir grupos espaciadores de manera que el sitio de unión al antígeno del anticuerpo permanezca accesible. Los anticuerpos inmovilizados se pueden utilizar después para unirse a organismos de *E. canis* o a antígenos de *E. canis* de una muestra, tal como una muestra biológica incluyendo saliva, suero, esputo, sangre, orina, heces, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico, exudado de heridas, o tejido. Los organismos de *E. canis* o los antígenos de *E. canis* se recuperan de la matriz de la columna, por ejemplo, por medio de un cambio en el pH.

Los anticuerpos descritos en la presente memoria también se pueden utilizar en estudios de inmunolocalización para analizar la presencia y distribución de un polipéptido descrito en la presente memoria 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 descritos

en la presente memoria, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos monoclonales y anticuerpos de cadena sencilla, se pueden utilizar para controlar el transcurso del alivio de una enfermedad causada por *E. canis*. Al medir el aumento o la disminución de anticuerpos de *E. canis* contra antígenos de *E. canis* en una muestra de ensayo de un animal, se puede determinar si un régimen terapéutico concreto, destinado a mejorar el trastorno es eficaz. Los anticuerpos se pueden detectar y/o cuantificar utilizando, por ejemplo, análisis de unión directa, tales como RIA, ELISA, o análisis de transferencia Western.

Detección

Los métodos descritos en la presente memoria se pueden llevar a cabo utilizando, por ejemplo, mecanismos de inmunoanálisis bien conocidos por los expertos en la técnica, incluyendo, pero no limitados a, el uso de microplacas y dispositivos de flujo lateral. En una realización, se inmovilizan uno o más antígenos DIVA de *E. canis* sobre un soporte sólido en una ubicación distinta. La detección de complejos de antígeno-anticuerpo sobre el soporte sólido puede ser mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 5.726.010 describe un ejemplo de un dispositivo de flujo lateral útil en la presente invención. El dispositivo descrito en la presente memoria se puede utilizar para detectar uno o más anticuerpos para antígenos de *E. canis*.

La inmovilización de uno o más reactivos de captura de analito, *p. ej.*, polipéptidos de *E. canis*, sobre un dispositivo o soporte sólido se realiza de modo que el reactivo de captura de analito no sea arrastrado por la muestra, el diluyente y/o los procedimientos de lavado. Se pueden anclar uno o más reactivos de captura de analito a una superficie mediante adsorción física (*es decir*, sin la utilización de conectores químicos) o por medio de unión química (*es decir*, con la utilización de conectores químicos). La unión química puede generar un anclaje más fuerte de los reactivos de captura sobre una superficie y proporcionar una orientación definida y una conformación de las moléculas unidas a la superficie.

Otra realización descrita en la presente memoria proporciona un dispositivo que es adecuado para un análisis de flujo lateral. Por ejemplo, se añade una muestra de ensayo a una matriz de flujo en una primera región (una zona de aplicación de la muestra). La muestra de ensayo es llevada en un lecho de flujo 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 ensayo. 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. Se forma un segundo complejo 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 a un anticuerpo de *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 anticuerpos de *E. canis*. La marca que forma parte del segundo complejo se puede visualizar directamente.

En otro aspecto, en la presente memoria se describen uno o más reactivos de unión específica marcados que pueden mezclarse con una muestra de ensayo antes de la aplicación a un dispositivo descrito en la presente memoria. En este caso, no es necesario haber marcado los reactivos de unión específica depositados y secados sobre una tira de reactivo de unión específica en el dispositivo. Un reactivo de unión específica marcado, ya sea añadido a una muestra de ensayo o depositado previamente sobre el dispositivo, puede ser, por ejemplo, un anticuerpo marcado que se une específicamente a un anticuerpo para *E. canis*.

Cualquiera o todas las realizaciones anteriores se puede proporcionar en forma de un kit. En un ejemplo concreto, semejante kit incluiría un dispositivo completo con reactivos de unión específica (*p. ej.*, un reactivo de unión específica marcado no inmovilizado y un reactivo de captura de analito inmovilizado) y un reactivo de lavado, así como un reactivo detector y reactivos de control positivo y negativo, si se desea o es apropiado. Además, se pueden incluir otros aditivos, tales como estabilizantes, tampones, y similares. Las cantidades relativas de los diversos reactivos pueden ser variadas, para proporcionar concentraciones en disolución de los reactivos que optimicen sustancialmente la sensibilidad del análisis. Concretamente, los reactivos se pueden proporcionar en forma de polvos secos, habitualmente liofilizados, que en disolución proporcionarán una disolución de reactivo que tenga las concentraciones apropiadas para combinarlos con una muestra.

Un antígeno DIVA de *E. canis*, *p. ej.*, un polipéptido, puede ser un reactivo de captura de analito inmovilizado en una zona de reacción (fase sólida). Un segundo reactivo de captura de analito, *p. ej.*, un anticuerpo anti-IgG o anti-IgM, que ha sido conjugado con una marca, o bien puede ser añadido a la muestra antes de añadir la muestra al dispositivo, o bien el segundo reactivo de captura del analito puede ser incorporado al dispositivo. Por ejemplo, el reactivo de unión específica marcado puede ser depositado y secado sobre un lecho de flujo 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 da como resultado la disolución del reactivo de unión específica marcado.

El dispositivo también puede incluir un reactivo líquido que transporta el material no unido (*p. ej.*, una muestra de fluido que no ha reaccionado 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 servir solamente 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 tras la reacción con el producto 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 luz, el reactivo detector actúa simplemente como una solución de lavado facilitando la detección de la formación del complejo en la zona reactiva mediante el lavado del reactivo marcado no unido.

Pueden estar presentes dos o más reactivos líquidos 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 adicionalmente 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 exceso de material no unido se transporta lejos de la segunda región, momento en el que se produce el producto final detectable.

Métodos de tratamiento, alivio o prevención de una enfermedad causada por *E. canis*

En una realización descrita en la presente memoria, se puede utilizar un polipéptido DIVA, un polinucleótido o un anticuerpo descritos en la presente memoria para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*. Sin embargo, si se utiliza un polipéptido DIVA para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*, éste no podría, a partir de entonces, ser utilizado como polipéptido DIVA para la detección y diferenciación de los animales infectados, no vacunados, y vacunados porque el sistema inmunológico de un animal vacunado reconocería el antígeno DIVA utilizado para la vacunación. Sin embargo, un polipéptido DIVA que no presenta reacción cruzada con anticuerpos para el polipéptido DIVA utilizado para el tratamiento, alivio o prevención de una enfermedad causada por *E. canis* todavía puede ser utilizado como un antígeno DIVA de *E. canis*.

Por ejemplo, si la SEQ ID NO: 2 o un fragmento del mismo se utiliza como una vacuna, en ese caso se pueden utilizar las SEQ ID NOs: 4, 6, 8, 10, 12, 14, 15, 16, 17 o combinaciones de los mismos como un polipéptido DIVA, si no presentan reacción cruzada con anticuerpos específicos para la SEQ ID NO: 2. Por lo tanto, los polipéptidos DIVA, polinucleótidos, y anticuerpos se pueden utilizar de dos maneras diferentes: (1) en forma de composiciones para la prevención, tratamiento, o alivio de una enfermedad o infección causada por *E. canis*; y (2) en forma de un antígeno DIVA de *E. canis* para la detección y diferenciación de animales que están vacunados; no vacunados; infectados o no infectados con *E. canis*.

Los polipéptidos, polinucleótidos y anticuerpos descritos en la presente memoria se pueden utilizar para tratar, aliviar o prevenir una enfermedad causada por *E. canis*. Por ejemplo, un anticuerpo, tal como un anticuerpo monoclonal descrito en la presente memoria o fragmentos del mismo, se puede administrar a un animal, tal como un ser humano. En una realización descrita en la presente memoria un anticuerpo o fragmento del mismo se puede administrar a un animal en una composición farmacéutica que comprende un portador farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmentos del mismo. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad eficaz en el alivio de los síntomas de la infección por *E. canis* o en la reducción de la cantidad de organismos de *E. canis* en un sujeto.

Los polipéptidos o polinucleótidos descritos en la presente memoria pueden estar presentes en una composición inmunogénica y utilizarse para provocar una respuesta inmunitaria en un anfitrión. Una composición inmunogénica es capaz de inducir una respuesta inmunitaria en un animal. Una composición inmunogénica de polipéptidos o polinucleótidos descrita en la presente memoria es particularmente útil en la sensibilización de un sistema inmunitario de un animal de manera que, como resultado, se produce una respuesta inmunitaria que alivia o previene el efecto de la infección por *E. canis*. El desencadenamiento de una respuesta inmunitaria en un modelo animal puede resultar de utilidad para determinar, por ejemplo, las dosis o las rutas de administración óptimas. El desencadenamiento de una respuesta inmunitaria también puede ser utilizado para tratar, prevenir, o aliviar una enfermedad o infección causadas por *E. canis*. Una respuesta inmunitaria incluye respuestas inmunitarias humores o respuestas inmunitarias mediadas por células, o una combinación de las mismas. Una respuesta inmunitaria puede comprender también la promoción de una respuesta generalizada del anfitrión, p. ej., 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 frente a la infección y el aclaramiento de la infección. La detección y/o la cuantificación de los títulos de anticuerpos después de la liberación de un polipéptido o polinucleótido se pueden utilizar para identificar epítomos que son particularmente eficaces en la obtención de los títulos de anticuerpos. Los epítomos 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 provocados por un epítomo de polipéptido en particular, se pueden someter a ensayo a continuación usando, por ejemplo, un análisis ELISA para determinar qué polipéptidos contienen epítomos que son los más eficaces en la generación de una respuesta fuerte. Los polipéptidos o proteínas de fusión que contienen estos epítomos o los polinucleótidos que codifican los epítomos pueden ser contruidos y utilizados a continuación para provocar una respuesta de anticuerpos fuerte.

Un polipéptido, polinucleótido, o anticuerpo descritos en la presente memoria se pueden administrar a un mamífero, tal como un ratón, conejo, cobaya, macaco, babuino, chimpancé, ser humano, vaca, oveja, cerdo, caballo, perro, gato, o a animales tales como pollos o patos, para provocar anticuerpos *in vivo*. La inyección de un polinucleótido tiene las ventajas prácticas de la simplicidad de la construcción y la modificación. Además, la inyección de un polinucleótido da como resultado la síntesis de un polipéptido en el anfitrión. Por lo tanto, el polipéptido se presenta al sistema inmunitario del anfitrión con las modificaciones post-traduccionales, la estructura y la conformación nativas. Un polinucleótido puede ser liberado en un sujeto en forma de "ADN desnudo".

La administración de un polinucleótido, polipéptido o anticuerpo puede ser por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo inyección intramuscular, intravenosa, intrapulmonar, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, o subcutánea, aerosol, administración intranasal, bomba de infusión, supositorio, administración por la mucosa, tópica, y oral, incluyendo la inyección usando una pistola balística biológica ("pistola de genes"). Un polinucleótido, polipéptido, o anticuerpo pueden estar acompañados por un portador de proteína para la administración oral. También se puede utilizar una combinación de métodos de administración para provocar una respuesta inmunitaria. Los anticuerpos pueden ser administrados a una dosis diaria de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 200 mg. En una realización descrita en la presente memoria se administran los anticuerpos a una dosis diaria de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg.

Los portadores y diluyentes para uso terapéutico farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R. Gennaro ed. (1985)). El portador en sí no debería inducir la producción de anticuerpos perjudiciales para el anfitrión. Tales portadores incluyen, pero no se limitan a, grandes macromoléculas, metabolizadas lentamente, tales como proteínas, polisacáridos tales como SEFAROSA® funcionalizada con látex, agarosa, celulosa, cuentas de celulosa y similares, poli(ácidos lácticos), poli(ácidos glicólicos), aminoácidos poliméricos tales como poli(ácido glutámico), polilisina, y similares, copolímeros de aminoácidos, peptoides, lipitoides y partículas de virus o células bacterianas, avirulentas inactivas. Los liposomas, hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables, y bioadhesivos también se pueden utilizar como portadores para una composición descrita en la presente memoria.

Las sales farmacéuticamente aceptables también se pueden utilizar en las composiciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, sales minerales tales como hidroclozuros, hidrobromuros, fosfatos, o sulfatos, así como sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, o benzoatos. Los sustratos proteicos especialmente útiles son albúminas de suero, hemocianina de lapa californiana, moléculas de inmunoglobulina, tiroglobulina, ovoalbúmina, toxoide tetánico, y otras proteínas bien conocidas por los expertos en la técnica. Las composiciones descritas en la presente memoria también pueden contener líquidos o excipientes, tales como agua, solución salina, solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer, solución de Hank, glucosa, glicerol, dextrosa, maltodextrina, etanol, o similares, solos o combinados, así como sustancias tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes, agentes de ajuste de la tonicidad, detergentes, o agentes tamponadores del pH. También se pueden utilizar agentes activos adicionales, tales como agentes bactericidas.

Si se desea, se pueden incluir 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, en una composición descrita en la presente memoria. Opcionalmente, también se pueden incluir coadyuvantes en una composición. Los coadyuvantes son sustancias que se pueden utilizar para aumentar de forma no específica una respuesta inmunitaria específica. En general, un coadyuvante y un polipéptido descritos en la presente memoria se mezclan antes de la presentación al sistema inmunitario, o se presentan por separado, pero se presentan en el mismo sitio del animal. Los coadyuvantes pueden incluir, por ejemplo, coadyuvantes oleosos (p. ej., coadyuvantes completo e incompleto de Freund), sales minerales (p. ej., $\text{Al}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNa}(\text{SO}_4)_2$, $\text{AlNH}_4(\text{SO}_4)$, Sílice, Alumbre, $\text{Al}(\text{OH})_3$ y $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), polinucleótidos (es decir, ácidos poli-IC y poli-AU), y ciertas sustancias naturales (p. ej., cera D de *Mycobacterium tuberculosis*, así como sustancias que se encuentran en *Corynebacterium parvum*, *Bordetella pertussis* y miembros del género *Brucella*). Los coadyuvantes que se pueden utilizar incluyen, pero no se limitan a MF59-0, hidróxido de aluminio, N-acetil-muramilo-L-treonil-D-isoglutamina (thr-MDP), N-acetil-nor-muramilo-L-alanilo-D-isoglutamina (CGP 11637), denominada nor-MDP, N-acetilmuramilo-L-alanilo-D-isoglutaminilo-L-alanina-2-(1'-2'-dipalmitoil-sn-glicero-3-hidroxifosforilo)-etilamina (CGP 19835 A, denominado MTP-PE), y RIBI, que contiene tres componentes extraídos de bacterias, monofosforilo lípido A, dimicolato de trehalosa y esqueleto de la pared celular (MPL + TDM + CWS) en una emulsión de escualeno al 2%/Tween®80.

Las composiciones descritas en la presente memoria se pueden formular en forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, formulaciones inyectables, colutorios, dentífricos, y similares. El porcentaje de uno o más polipéptidos, polinucleótidos o anticuerpos descritos en la presente memoria 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 inmunitaria en el animal que dura al menos 1 semana, 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, o más. Opcionalmente, una respuesta inmunitaria se puede mantener en un animal, proporcionando una o más inyecciones de refuerzo del polipéptido, polinucleótido, o anticuerpos en 1 mes, 3 meses, 6 meses, 1 año, o más después de la inyección primaria. Si se desea, también se pueden proporcionar moléculas co-estimuladoras o coadyuvantes antes, después o junto con las composiciones.

Una composición descrita en la presente memoria que comprende un polipéptido, polinucleótido, anticuerpo, o una combinación de los mismos se administra de una manera compatible con la composición concreta utilizada y en una cantidad que es eficaz para provocar una respuesta inmunitaria como se detecta, por ejemplo, por medio de un ELISA. Se puede inyectar un polinucleótido por vía intramuscular a un mamífero, tal como un babuino, chimpancé, perro, o ser 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. Se puede inyectar un polipéptido o anticuerpo por vía intramuscular a un mamífero a 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 los mismos 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 dosificaciones concretas de polinucleótidos, polipéptidos o anticuerpos en una composición dependerán de muchos factores incluyendo, pero no limitados a la especie, la edad, el género, la medicación concurrente, el estado general del mamífero al que se administra la composición, y el modo de administración de la composición. Una cantidad eficaz de la composición descrita en la presente memoria se puede determinar fácilmente utilizando sólo experimentación de rutina.

En cada caso en la presente memoria, cualquiera de los términos "que comprende", "que consiste esencialmente en", y "que consiste en" se puede reemplazar por cualquiera de los otros dos términos. Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención de que en el uso de tales términos y expresiones se excluyan los equivalentes de las características mostradas y descritas o partes de los mismos.

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

Ejemplos

Ejemplo 1

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

Se hizo crecer *E. canis* en cultivo celular canino utilizando los métodos descritos en la bibliografía. Véase, p. ej., Breitschwerdt, Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1998, Vol 42: 362-368. Utilizando la microscopía óptica, se estimó que 030 células estaban infectadas en más de 80% por *E. canis*. Se recogieron dos litros de cultivo celular infectado por *E. canis*, se centrifugaron y el sedimento se retuvo obteniéndose 7,31 g de material (peso húmedo). Se presume que el agua representaba 80% del peso del material, proporcionando un peso seco estimado de 1,462 g (20% del peso del material). El sedimento de células se resuspendió hasta 20 mg/ml en PBS (peso seco) para un volumen total de 73 ml.

A este sedimento celular resuspendido, se le añadieron 0,73 ml de solución de formalina (Catálogo Sigma Solución de formalina HT50-1-2 al 10%, tamponada 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 sedimento celular se conservó. El sedimento se lavó por resuspensión en 250 ml de PBS. El material se recogió por centrifugación y el lavado se repitió una vez. El sedimento celular lavado se resuspendió en 73 ml de PBS. La muestra se dividió en alícuotas para 73 viales de tapa de rosca y se congeló a -80°C. Cada vial contiene 20 mg (peso seco) de cultivo celular de *E. canis* inactivado con formalina, adecuado para la combinación con el coadyuvante apropiado para la inmunización en animales.

Ejemplo 2

Preparación de *E. canis* fijado con formalina con dos coadyuvantes diferentes, protocolo para la inmunización de perros beagle con antígeno de *E. canis*, y ensayo de sueros de perros beagle inmunizados utilizando SNAP® 3Dx®.

La preparación de antígeno con coadyuvante de hidróxido de aluminio es un mecanismo bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, véase "Antibodies, A Laboratory manual", Cold Spring Harbor Press, 1988, pág. 99.

Para la inmunización en perros (perros beagle de laboratorio), se prepararon dos conjuntos de dosis con coadyuvante de hidróxido de aluminio preparado como se describe más arriba y se prepararon dos conjuntos de dosis con coadyuvante Ribi (Corixa Corp., Seattle WA) utilizando el protocolo descrito por el fabricante. Cada dosis contenía aproximadamente 20 mg de cultivo celular de *E. canis* inactivado con formalina (peso seco).

Se seleccionaron perros beagle de laboratorio mantenidos en una perrera para la inmunización con antígeno inactivado con formalina de *E. canis*. A dos grupos de dos perros cada uno; utilizando cada grupo un coadyuvante diferente, se les administraron dosis de preparación de *E. canis* fijada con formalina (óxido de aluminio o Ribi). El día 0 se encontró que 4 perros eran sero-negativos utilizando tanto el diagnóstico SNAP® 3Dx®, así como el análisis de transferencia Western utilizando el organismo *E. canis*.

El comité IACUC de Covance Research Products Inc. aprobó el protocolo para la inmunización de los perros beagle de laboratorio. Los perros fueron sensibilizados los días 0, 28 y 56 con tomas de muestras de sangre de 1 ml semanales que fueron controladas utilizando SNAP® 3Dx®. Todos los perros recibieron dosis con el artículo de ensayo apropiado por vía subcutánea en la zona dorsoescapular. Los cuatro animales fueron seroconvertidos a un ensayo positivo en *E. canis* SNAP® 3Dx® el día 42. Se tomaron muestras de sangre de la producción los días 42 y 70 (aproximadamente 50 ml de sangre que produjeron aproximadamente 25 ml de suero).

La Figura 1 muestra la evaluación con el SNAP® 3Dx® Assay de perros beagle de laboratorio. El dispositivo SNAP® se utilizó como describe el fabricante. La muestra "Pre" es del día 0. La muestra "Post" es del día 42. Las aplicaciones positivas para *E. canis* se convierten en positivas en los 4 perros para la muestra del día 42. Se observaron resultados similares para la muestra del día 70.

Los experimentos con una tercera vacuna que comprendía un tercer coadyuvante, 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 coadyuvante Ribí descrita anteriormente, excepto: 1) la inactivación con formalina fue durante 24 horas a 4°C, y 2) se añadió 1 mg de BCG. El programa de vacunación fue día 0, día 14, con tomas de sangre semanales analizadas para determinar la reactividad con proteínas de *E. canis*.

Ejemplo 3

Enriquecimiento de *E. canis* a partir del cultivo celular utilizando gradientes de PERCOLL®.

Para el aislamiento de ADN y el análisis de transferencia Western, se enriqueció *E. canis* del cultivo celular utilizando gradientes de densidad de PERCOLL®. El procedimiento de aislamiento de patógenos intracelulares del cultivo de células, tales como *Ehrlichia*, es un mecanismo bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, véase Akira et al. (1982) Purification of Rickettsia tsutsugamushi by PERCOLL® density gradient centrifugation, Microbiol. Immunol., 26: 321-328.

Un enriquecimiento de *E. canis* típico se inició con 1,5 litros de cultivo de células infectadas (véase más arriba). Las células se centrifugaron a 6000 xg, el sedimento celular se conservó y el sobrenadante se descartó. El sedimento de células se resuspendió en 20 ml de PBS que estuvo seguido por una segunda centrifugación. El sobrenadante se descartó y el sobrenadante se conservó. A continuación, el sedimento se resuspendió en 20 ml de PBS, se sometió a sonicación durante 5 segundos a 20 kHz, se ajustó la potencia a 1,5 usando un sonicador Branson. La muestra se centrifugó a continuación a 500 xg durante 5 minutos para sedimentar los desechos grandes.

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 ultracentrífuga 70,1 Ti, y se centrifugó durante 30 minutos a 63.000 x g. La banda opaca se recogió con una pipeta Pasteur. La banda opaca está altamente enriquecida en *Ehrlichia* (confirmado mediante microscopía óptica de la muestra recogida). Después de una dilución 1:4 con PBS, la muestra se dividió en alícuotas y se centrifugó a 12.000 x g. El sobrenadante fue descartado y el sedimento de *Ehrlichia* se almacenó a -80°C.

Ejemplo 4

Ensayo de suero o plasma de perros sensibilizados e infectados por medio de transferencia Western.

El uso del análisis en gel SDS-PAGE unidimensional y del análisis en gel bidimensional (1ª dimensión isoelectroenfoque, 2ª dimensión SDS-PAGE) es bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo véase 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 transferencias Western para analizar las proteínas separadas por medio de estos métodos es bien conocido para los expertos en la técnica. Por ejemplo véase Current Protocols in Molecular Biology, eds. F. M. Ausubel et. al., John Wiley & Sons Inc., 1997, páginas 10.8.1-10.8.116.

El trabajo inicial se realizó utilizando el análisis Western de proteínas separadas con geles 1D (datos no mostrados), seguido por análisis de Western de proteínas separadas usando geles 2D. Las proteínas de *E. canis* completa cosechadas de cultivo celular se analizaron utilizando la electroforesis en gel 2D (materiales y reactivos usados como describe el fabricante; Bio-Rad Life Sciences Research, Hercules, CA 94547). La cantidad de muestra que se iba a cargar por gel se determinó empíricamente (véase la Figura 2). Las proteínas se transfirieron a nitrocelulosa y se sondearon utilizando sueros caninos de perros beagle de laboratorio el día 0, perros sensibilizados con antígeno de *E. canis* fijado con formalina (véase más arriba), o sueros de animales infectados con *E. canis* (véanse las Figuras 3, 4 y 5).

Se aislaron suero y plasma caninos positivos de perros infectados con *E. canis*. La infección con *E. canis* se verificó mediante análisis Western de los linfocitos cosechados a partir de sangre completa de estos perros, y se confirmó por medio del uso del análisis IDEXX SNAP® 3Dx® con suero o plasma caninos (disponible comercialmente de IDEXX Laboratories Inc., que se utiliza como describe el fabricante).

Para el análisis de transferencia Western las proteínas se separaron con geles de SDS/PAGE 1D o de

isoelectroenfoque/SDS-PAGE 2D seguido de electro-transferencia de las proteínas de los geles a nitrocelulosa. Las transferencias de nitrocelulosa se incubaron en una solución de bloqueo de leche en polvo no grasa al 2,5% disuelta en solución salina tamponada con Tris (pH 7,5), TWEEN®20 al 0,05%. Los sueros o plasmas caninos se diluyeron hasta el título como se ha descrito en tampón que contenía un producto lisado de *E. coli* para bloquear la unión no específica con sueros normales de ternero al 30% y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C. Después de lavar 3 veces en TBS-Tween® (0,05%), las transferencias se transfirieron a un tampón que contenía suero de ternera fetal al 50%, TBS-Tween®-Kathon al 50% (0,05% y 0,5%, respectivamente) para evitar la unión no específica de un producto de anticuerpo policlonal anti-Fc canino de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson Immuno Research, West Grove, PA 19390). El producto conjugado de anticuerpo policlonal anti-Fc canino de conejo se diluyó 1:5.000. Los geles se lavaron 3 veces con TBS TWEEN® (0,05%), una vez con TBS, y se detectó la presencia de HRP utilizando ECL Western Blotting Detección Reagents (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ 08855-1327) empleado como describe el fabricante. Las imágenes digitales de la película de rayos X expuesta fueron capturadas utilizando un GelDoc 2000 (Bio-Rad Inc.).

Ejemplo 5

Aislamiento de ADN a partir de *E. canis* y construcción de una biblioteca de expresión en lambda y escrutinio de la biblioteca de expresión en lambda de *E. canis* para los clones que tienen actividad DIVA.

La preparación y el escrutinio de las bibliotecas de expresión en lambda es un mecanismo bien conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, véase 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, el ADN genómico se purificó a partir *E. canis* aislado de cultivo celular mediante centrifugación en gradiente de PERCOLL® (véase más arriba). El ADN se purificó utilizando un kit de purificación de ADN genómico de Qiagen Sciences (Germantown, MD). Se utilizó un kit Vector Lambda ZAP®II predigerido con EcoRI/CIAP (Stratagene Corp., La Jolla, CA 92037) tal como especifica el fabricante para la construcción de la biblioteca. El ADN genómico de *E. canis* se digirió parcialmente con TSP509 y los fragmentos que oscilaban entre 2 y 6 kb se aislaron utilizando la electroforesis en gel de agarosa y se ligaron en el vector lambda. Los fagos se empaquetaron y se cultivaron como especifica el fabricante.

Se rastrearon 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 la reactividad con sueros de animales sensibilizados con *E. canis* desarrollado en cultivo de células (véase más arriba). En el escrutinio inicial se identificaron 84 placas individuales por tener esta actividad.

Se sometieron placas lambda a dos rondas de purificación en placa y se volvieron a someter a ensayo para verificar la reactividad positiva con sueros de animales infectados con *E. canis*, la reactividad negativa se escrutó con sueros de animales sensibilizados.

Las placas de lambda aisladas fueron escrutadas 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 manchada de las Montañas Rocosas), *Leptospira interrogans* y *Dirofilaria immitis* (agente causante de la dirofilariosis canina).

Al final del proceso de escrutinio, se encontró que 43 placas de lambda reaccionaban con sueros de animales infectados con *E. canis* que no reaccionaron con sueros de sensibilización o sueros de perros infectados con otros patógenos caninos (véase más arriba).

Utilizando 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 Blue para la expresión de proteínas y el análisis de las proteínas codificadas mediante transferencia Western. Los extremos de los insertos de ADN de *E. canis* se sometieron a análisis de la secuencia de ADN utilizando cebadores de secuenciación T7 y T3.

La información de la secuencia de las reacciones tanto con T7 como con T3 de los 43 clones se presentó para el análisis BLAST en la página web NCBI. Los resultados se tabularon en formato excel. Basándose en la identidad de secuencia entre el clon y la secuencia del genoma de la pistola génica disponible para *E. canis* (NCBI: NZ-AAEJ01000001), se identificaron los segmentos de ADN genómico de cada clon. Los clones individuales que compartían genes comunes se agruparon para su posterior análisis por medio de transferencia Western utilizando reservas de sueros caninos infectados y sensibilizados con bacterias. Basándose en patrones de bandas similares, se eliminaron los clones duplicados. Se eliminó cualquier clon que mostrara reactividad contra ambos conjuntos de sueros. Como resultado de este análisis, se seleccionaron 23 clones para una evaluación adicional. El agrupamiento de los clones y el antígeno común por grupo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1

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

Ejemplo 6

Análisis de transferencia de Western utilizando muestras de suero canino positivas para *E. canis* individuales

- 5 Los 23 clones fueron analizados 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 sólo fueron positivos para infecciones por *E. canis* mediante el ensayo ELISA/SNAP®. El suero canino se diluyó 1:500 en el mismo diluyente descrito en el Ejemplo 4 que contenía producto lisado de *E. coli* y se detectó la reactividad utilizando técnicas colorimétricas con peroxidasa de rábano picante convencionales (Opti-4CN, Bio-Rad). Se
- 10 evaluaron un total de trece muestras de suero canino individuales. Las transferencias se compararon a través de muestras para determinar el número de perros que mostraban reactividad con una banda predominante o conjunto de bandas por clon. Los resultados se resumen en la Tabla 2 y en la Figura 6 (los clones enumerados en negrita se representan en la figura).

Tabla 2

Antígeno Común	Número de Clones	Reactores positivos
Antígeno de 120 kDa	2, 10, 17 , 33, 35	13/13
Proteínas de choque térmico	9	12/13
ATPasa	7, 84	12/13
Proteína ribosomal L1	21, 47, 65	12/13
Antígeno de 200 kDa	26, 55 , 76	12/13

- 15 Los 23 clones también fueron analizados por medio de transferencia Western utilizando suero canino reunido que había dado positivo para otras enfermedades infecciosas transmitidas por vectores. Se evaluaron las muestras que daban positivo mediante ELISA o SNAP® para las siguientes infecciones individuales: *Dirofilariasis*, enfermedad de Lyme, *Anaplasma phagocytophilum*, o *E. ewingii*. Ninguno de los clones identificados en la tabla anterior mostró
- 20 reactividad cruzada con sueros caninos positivos para estas otras infecciones transmitidas por vectores.

Ejemplo 7

Identificación de segmentos de genes relevantes que codifican antígenos DIVA de *E. canis*.

a. Antígeno de 120 kDa

Este antígeno había sido descrito previamente por Yu et al. (J Clin Microbiol. 2000 Ene; 38 (1):369-74) y se había demostrado que era útil en el diagnóstico de infecciones por *E. canis* en perros. El número de acceso para este gen es AF112369 y la proteína asociada es AAD34330. Los clones 2, 10, 17 y 33 contienen segmentos completos del gen del antígeno de 120 kDa. El clon 35 puede contener un truncamiento de este gen. (Véanse las SEQ ID NO: 1 y 2).

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

P120 tiene un motivo de 36 aminoácidos que se repite 14 veces. Véase la Figura 8, SEQ ID NO: 15. La porción repetida (región subrayada en la Figura_8) es un péptido de 60 kD. La Figura 9A muestra las 14 repeticiones alineadas (SEQ ID NO: 16). La Figura 9B muestra la secuencia consenso de las 14 repeticiones (SEQ ID NO: 17). En la presente memoria se describe un polipéptido que comprende:

KEEX₁TPEVX₂AEDLQPAVDX₃SX₄EHSSEVGX₅KVSX₆TS (SEQ ID NO: 17).

donde

X₁ = S o N

X₂ = K o R

X₃ = G, D o S

X₄ = V o I

X₅ = E o K

X₆ = E o K

Otra realización descrita en la presente memoria proporciona un polipéptido multimérico donde la SEQ ID NO: 17 se repite dos o más veces. El polipéptido multimérico puede comprender también uno o más polipéptidos heterólogos.

b. Antígeno de 200 kDa

Este antígeno había sido descrito previamente por McBride et al. (J Clin Microbiol. 2001 Ene; 39(1): 315-22) y se ha demostrado que es útil en el diagnóstico de la ehrlichiosis. El número de acceso para este gen es AF252298 y la proteína asociada AAK01145. Una porción de esta secuencia de la proteína se asocia con una patente publicada (SEQ ID NO: 2 de la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.355.777, número de acceso AAE96254). Los autores de la presente invención 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 abarca desde el nucleótido 1081 de AF252298 hasta el final, nucleótido 4266. (Véanse las SEQ ID NO: 3 y 4).

Este gen se amplificó a partir de ADN genómico de *E. canis* y se subclonó en un sistema de expresión pET con una etiqueta 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coincidían exactamente con la secuencia del gen que codificaba la proteína mostrada en la SEQ ID NO: 4, a partir de los aminoácidos 1 a 1061. Se analizaron los productos lisados proteicos de bacterias BL21 en las que se había inducido la expresión de esta proteína por medio de transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con transferencias Western sondeadas con sueros de animales sensibilizados con organismos adaptados al cultivo. En consonancia con los resultados anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocían esta proteína de peso molecular esperado (datos no mostrados).

c. ATPasa

Este gen (etiqueta Locus "Ecan02000699") ha sido pronosticado por análisis computacional automatizado de la secuencia del genoma de la pistola génica de *E. canis*. Codifica una proteína de más de 4000 aminoácidos (ZP_00210575). El escrutinio DIVA de *E. canis* identificó dos regiones separadas de este gen y su proteína asociada

como posibles antígenos inmunodominantes y reactivos DIVA. Los segmentos de la proteína identificada en los clones 84 y 7 son los aminoácidos 1984-2774 y 2980-3740, respectivamente, del número de acceso 46308382. (Véanse las SEQ ID NO: 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 etiqueta 6-His de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). Los resultados de la secuenciación de este plásmido coinciden exactamente con las secuencias de genes asociados con las proteínas mostradas en las SEQ ID NO: 6 y 8, a partir de los aminoácidos 1 a 782 y 1 a 746 respectivamente. Los productos lisados de proteína de bacterias BL21 en las que se había inducido la expresión de estas proteínas se analizaron por transferencia Western con sueros caninos infectados y se compararon con transferencias Western sondeadas con sueros de animales sensibilizados con organismos adaptados al cultivo. En consonancia con los resultados anteriores, solamente los sueros de perros infectados reconocieron estas proteínas de peso molecular esperado (datos no mostrados).

d. Proteínas de choque térmico

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

Debido a que esta proteína solamente es pronosticada a partir de la anotación informática del genoma y no ha sido identificada previamente a partir de 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 inmunitaria en el anfitrión canino infectado. La proteína se identificará como antígeno p16 (véanse las SEQ ID NOs: 9 y 10).

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

e. Proteína ribosomal L1

Este gen es identificado por la etiqueta de locus "Ecan02000476" del genoma de *E. canis*. La proteína asociada tiene el número de acceso ZP_00211130 (véanse las SEQ ID NO: 11 y 12). La identificación de esta proteína se ha pronosticado basándose en el análisis computacional automatizado del genoma. Un análisis BLAST de esta proteína revela que la secuencia es idéntica aproximadamente en 70% a una proteína de la superficie de *E. chaffeensis* (Número de acceso 4894576). La inmunorreactividad con la proteína de *E. chaffeensis* ha sido previamente referida por Yu et al., (J Clin Microbiol. 1999 Agosto; 37(8): 2568-75). La proteína de *E. chaffeensis* (Número de acceso 4894576) se conoce como proteína precursora de 106 kDa.

f. Posibles antígenos No de 120 kDa

Dentro del fragmento genómico que contiene el gen para el antígeno de 120 kDa, están presentes otros genes que también pueden ser reactivos inmunodominantes y DIVA. Por ejemplo, el clon 10 produce un patrón de bandas diferente en transferencias Western sondeadas 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 ruta secretora de Tipo IV y esta secuencia génica es identificada por la etiqueta de locus "Ecan02000624". Este gen codifica una proteína de 723 aminoácidos (ZP_00211244), pero sólo aparece una porción de esta proteína que es expresada por el clon 10, según lo determinado por el peso molecular de la proteína identificada en el gel (véanse las SEQ ID NOs: 13 y 14)

SEQ ID NO:1 Secuencia de nucleótidos del antígeno de 120kDa ORIGEN

```

1 ATGGATATTG ATAACAATAA TGTGACTACA TCAAGTACGC AAGATAAAAG TGGGAATTTA
61 ATGGAAGTGA TTATGCGTAT ATTAATTTT GGTAAATAATT CAGATGAGAA AGTAAGCAAT
121 GAAGACACTA AAGTTCTTGT AGAGAGTTTA CAACCTGCTG TGAATGACAA TGTAGGAAAT
181 CCATCAAGTG AAGTTGGTAA AGAAGAAAAT GCTCCTGAAG TTAAGCGGA AGATTTGCAA
241 CCGCTGTAG ATGGTAGTGT AGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGGAAAAA AGTATCTGAA
301 ACTAGTAAAG AGGAAAGTAC TCCTGAAGTT AAAGCAGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
361 GGTAGTATAG AACATTTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTAAAC TAGTAAAGAG
421 GAAAGTACTC CTGAAGTTAA AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGA TAGTGTGGAA
481 CATTTCATCA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAAACTA GTAAAGAGGA AAATACTCCT
541 GAAGTTAAAG CAGAAGATT GCAACCTGCT GTAGATGGTA GTATAGAACA TTCATCAAGT
601 GAAGTTGGAG AAAAAGTATC TAAACTAGT AAAGAGGAAA GTAACCTCTGA AGTTAAAGCA
661 GAAGATTTCG AACCTGCTGT AGATGATAGT GTGGAACATT CATCAAGTGA AGTTGGAGAA
721 AAAGTATCTG AAAGTAGTAA AGAGGAAAAT ACTCCTGAAG TTAAGCAGA AGATTTGCAA
781 CCGCTGTAG ATGGTAGTGT GGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGGAAAAA AGTATCTAAA
841 ACTAGTAAAG AGGAAAGTAC TCCTGAAGTT AAAGCAGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
901 GATAGTGTGG AACATTTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTGAAAC TAGTAAAGAG
961 GAAAACTACT CTGAAGTTAG AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGG TAGTGTAGAA
1021 CATTTCATCA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAAACTA GTAAAGAGGA AAGTACTCCT
1081 GAAGTTAAAG CAGAAGATT GCAACCTGCT GTAGATAGTA GTATAGAACA TTCATCAAGT
1141 GAAGTTGGGA AAAAAGTATC TGAACCTAGT AAAGAGGAAA GTAACCTCTGA AGTTAAAGCA
1201 GAAGATTTCG AACCTGCTGT AGATGGTAGT GTAGAACATT CATCAAGTGA AGTTGGAGAA
1261 AAAGTATCTG AAAGTAGTAA AGAGGAAAAT ACTCCTGAAG TTAAGCAGA AGATTTGCAA
1321 CCGCTGTAG ATGGTAGTGT AGAACATTCA TCAAGTGAAG TTGGGAAAAA AGTATCTGAA
1381 ACTAGTAAAG AGGAAAATAC TCCTGAAGTT AAAGCGGAAG ATTTGCAACC TGCTGTAGAT
1441 GGTAGTGTAG AACATTTCATC AAGTGAAGTT GGAGAAAAAG TATCTGAAAC TAGTAAAGAA
1501 GAAAGTACTC CTGAAGTTAA AGCAGAAGAT TTGCAACCTG CTGTAGATGA TAGTGTAGAA
1561 CATTTCATCA GTGAAGTTGG AGAAAAAGTA TCTGAAACTA GTAAAGAGA AAGTACTCCT
1621 GAAGTTAAAG CGGAAGATT GCAACCTGCT GTAGATGGTA GTGTGGAACA TTCATCAAGT
1681 GAAGTTGGAG AAAAAGTATC TGAGACTAGT AAAGAGGAAA GTAACCTCTGA AGTTAAAGCG
1741 GAAGTACAGC CTGTTGCAGA TGGTAATCCT GTTCCTTTAA ATCCTATGCC TTCATTTAGT
1801 AATATTGATA CTAATATAAT ATTCCATTAC CATAAAGACT GTAAAAAGG TTCAGCTGTA
1861 GGAACAGATG AAATGTGTG TCCTGTATCA GAATTAATGG CTGGGGGAACA TGTTTCATATG
1921 TATGGAATTT ATGTCTATAG AGTTCAATCA GTAAAGGATT TAAGTGGTGT ATTTAATATA
1981 GATCATTCTA CATGTGATT TAATTTAGAT GTTTATTTTG TAGGATACAA TTCCTTTACT
2041 AACAAAGAAA CAGTTGATTT AATATAA

```

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

ORIGEN

```

1 MDIDNNVTT SSTQDKSGNL MEVIMRILNF GNNSDEKVS EDTKVLVESL QPAVNDNVGN
61 PSSEVGKEEN APEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGKKVSE TSKEESTPEV KAEDLQPAVD
121 GSIEHSSSEV GEKVSKESTKE ESTPEVKAED LQPAVDSDVE HSSSEVGEKV SETSKEENTP
181 EVKAEDLQPA VDGSIHSSSS EVGEKVSKE KEESTPEVKA EDLQPAVDSDS VEHSSSEVGE
241 KVSETSKEEN TPEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGEKVS TSKEESTPEV KAEDLQPAVD
301 DSVEHSSSEV GEKVSKESTKE ENTPEVRAED LQPAVDGSVE HSSSEVGEKV SETSKEESTP
361 EVKAEDLQPA VDSSIHSSSS EVGKKVSETS KEESTPEVKA EDLQPAVDGS VEHSSSEVGE
421 KVSETSKEEN TPEVKAEDLQ PAVDGSVEHS SSEVGEKVS TSKEENTPEV KAEDLQPAVD
481 GSVEHSSSEV GEKVSKESTKE ESTPEVKAED LQPAVDSDVE HSSSEVGEKV SETSKEESTP
541 EVKAEDLQPA VDGSEHSSSS EVGEKVSKE KEESTPEVKA EVQPVADGNP VPLNPMPSID
601 NIDTNIIFHY HKDCKKGS AV GTDEMCCPV S ELMAGEHVHM YGIYVYRVQS VKDLSGVFNI
661 DHSTCDCNLD VYFVGYSNFT NKETVDLI.

```

5

SEQ ID NO 3 Secuencia de nucleótidos del antígeno de 200kDa desde 1081 al final

ORIGEN

```

1 AATTTAGAT TTTGGACTTG TAGATGGAGA TGGTAAAAAT CCTTTACATC ATGCTGTTGA
61 ACATTTGCCA CCGTTTATAC TTAAGGGCGT AATGGACCAT GTAAAAATA GTAGTGAGTT
121 TCAAGATTTA GTAAATGATC CTGATTATTT TGGAAATACT ATAGCTCATT ATGCAGTTAA
181 GAATAAAAAA GCTGATTTAA CATTGTTTAA CATGCTGAAA GCTTCAGGAG GTGATTTAAA
241 TGTTAGGAAT GCTGTTGGTC GAGCTCCAAT ACATGTTGCT TCTTCTAATG CTAAGGCTAA
301 TGCAGTTTCT GGACTTGTAT CATGTGGTAT TGACGTTAAT TCTCAAGATG TGAATGGAGA
361 TACACCACTT CATATTGCTG TTGAAGGCGG TAGTATGGAG ACGGTATTAG CAGTGTAAAA
421 TCAGAGAGGT GCTGATGTTA GTGTCCAGAA TAACGATGGA GTTACACCTA TGCTTAGTGC

```

481 TGCTAAATAT GGAGATATAG GTGTAATAAA AGCTTTAGGT TCAGCTAAAC CAAATATTAA
541 AGGTGAAGAC ACTGTTGCTA AATCATTTGCT GATGGAGGAT TACAAGAGTT TTACACCCTT
601 GCATTTTGTA GCTGGTGGTG GTAGCAGAGA TACATTCGT GTCGTAAGAA AAAATTATGA
661 AAAATGTCAT GACTTAGCTA CTATTAGGGC AGCTTTAATG CAAGATAGAA GTGGTGGTGA
721 GCTTGTAAAT TTAGGGGATT TTGAAAGTGA AAATATATTG GGTTGCGCAA ATGCAAAATT
781 CTTGCAGCAT ATTCAATCAG CAAATTTTGG TTTTCTCCA GCGCATTTGT CTATAGTATC
841 GTCTAATCAC AATGTAATGA AAGATATCTT AAATTTTGT GGGGATTCGT TACACCTACC
901 AAGTGAGCGT GGGTATAATG CAATGCAGGT TGCTGCTTG TTTGGTGACA AAGAAGCAGT
961 GAAAATGCTT GCTAAAAGTG CTAAGCCAAG TGATCTTAAT TTTAAGACTT CAGCAACTCC
1021 TACTCCGTTA AATCTTGCTA GTCTTAGAGG TGATAATGAG GTAGTACGTG GGTTAGTAGG
1081 TCAACATGGT ATTGACATTA ACCAACGTAT GGGAAAGTAT AAAAACACTG TATTGCATTA
1141 TGCAATCAGC AAAGGAGATA GTTTTCTTGT GCAAAGATA TTAGCTCATA CTGGAGTTGA
1201 TGTTAATTGT GAGAATAACC TAGGTCAAAC GCCTTTACAT TTAGCAGTTG AGGGAGGAGA
1261 TCCTAAGATA GTATCTTCTC TTCTTAAAGC TGGTGCAGTA GTTAATCGTC TGGATGATAA
1321 TGGTAGATCT GTACTTTCTT CTGCGATAGT TCCAGGTAGA AAAGAAAAGG GAGTGCTGGG
1381 TATAGTTAAT AAATGCTGG ATAGAGGTGC AGATATTAAT TTAGATGGAG ACCACAATAT
1441 ACTTTTTGAT CAGTGTCTAA GGGGTGGATA TAATAATGTA TTAGATAAGT TAATACAACA
1501 AGGGGTTGAA GTTAATCGAA ATAGTGAAT ACGTCCAATG GTTTATGCTG CAATATCTGG
1561 TAATGAGCAT GCTATCAAT CATTAGCTAA TGCTGGTGA GATGTTAATG AAGTAGTAAA
1621 TAATCCATCT AGTAGGCATT CAGGAAATCC TTTAATTATG GTTGCAGTAG CAGATGGTAA
1681 TGCAGGTCTT CTTAAAACAT TAGTTTCTGA AGGATGTGAT GTTGGTAAAT CTGGAAAAGA
1741 TGGTAATACA GCGTTACATT ATGCTGTTAG TCATTAGAT AAAGAGTTTG GTAATAAAGC
1801 TATAAAGATA TTAATTTTAC GTAATAGTGT TGGGACTAAT AGAGATATTC TTACTCAAAA
1861 GAATAACGCA GGTGATACAC CTTTACATGA AGCTCTTAAG TCAGGTAATA TTAATTTCTGT
1921 ACAGAATATC TTAAGTGCTG TACATCCAAG ATACGCAAAG GAGATATTA CAGCCAGAGA
1981 CAAAGAAGGG TACACACCAA TGCATTATAC TGTTGGAGTA AATAATGTTG ATGTTGGTAG
2041 AAGTATTCTA GAGTCTATGC TCTCTAAAG TGTAATAAT CTGGAGAGA TTTGTTGGAGC
2101 ACAGGATAGT AATTTTCGAA CACCTCTGCA TGCTGCTATT AAAATATCTG ATTATCGTGC
2161 TGCGGACATG ATAATAGGTA GCTTATCGAA AACAGAATTG TCAAAAGTTAT CGCAATTAAAC
2221 AGATATTAAC GGGGATACAC CACTACATCT TTCTTGTCAG TCTGGTAATG TCGAGATGAC
2281 ACAATTCCTT CTTGGAGGTT TGGATAAACG TGAATTACCT AAGACATTAA AGATAGCAAA
2341 TAAAAATGGA GATACTCCTT TACATGATGC TATAAGAAAT GATGATATTA AATCTGCAAA
2401 AATGATGATT AGGAATTGTA ACAAAGAAGA ACTTGCTAAT GTATTAAAT GTAAAGATAG
2461 TTTTGGTAAT ACAGTATTGC ATACTATGTC TGACCAAGTT ATTGCGAATC CAGAATCAAA
2521 GAAAGACCTT GATGGTTTGA TGAATTTAGC AGTGAAAAGG CTAAGAATC AGATCTGAA
2581 AGATCTAGTT AATACGCGAA ATAACCTCTGA CGATACTGTT GCACATTGTG CTCTTTTATC
2641 GGATATGAAA TATGCTCAAA AGATACTTAA ATCATGTAAAC CATGATACAT TAGTGAGAGG
2701 AAATAGTAAT AATCAATCTT TATCAGAGTG TATTCTGAT GATAGTAAAT ATAAAAAAGG
2761 TGAATTTT AGTAAGTCTT TATTTTCAA ATTAAGAAGAA CTTGAGGCAC GAGCTGCCAG
2821 CGCTAGTTAT GAAGAATTAT CTAGTATCAG TAGTGGTAGT GATGTTTCTT CTGTATCAAC
2881 AAATAGCACA GAAGTAAGTG CAGTACCTGA AGTGCGAAGA AGTAGTGGTG CTGTGCTGTT
2941 CAAACATGTG CAAGAAACAG GAGTTGACAC GTCTGGTCTT TCTGATATAG AAAGTTTAGA
3001 GAGATTATCT GATACTAGTC TTGGGTCAAA TGATTTTGAT CAGCGAATGG CAGATTTAGA
3061 TCAAGAAATA GCAAATATTG TTAGTGGTTT ACCAGAAGTT ACCCAGGTAG CTGTAAGTCA
3121 ACAACAAGCA GCATCTCCTA GTTCAGGTCA AGCTGCTGGT GTGCAACAAA AAGAGATGCA
3181 GAGATAA

5

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

ORIGEN

1 NLDFGLVDGD GKNPLHHA VE HLPPVILKGV MDHVKNSEF QDLVNDPDYF GNTIAHYAVK
61 NKNADLT LFN MLKASGADLN VRNVVGRAP I HVASSNGKAN AVSGLVSCGI DVNSQDVNGD
121 TPLHIAVEGG SMETVLAVLN QRGADVSVQN NDGVT PMLSA AKYGDIGVIK ALGSAKPNIK
181 GEDTVAKSLL MEDYKGF TPL HFVAGGSRD TFRVVRKNYE KCHDLATIRA ALMQDRSGGE
241 LVNLGDFESE NILGSPNAKF LQHIQSANFG FSPAHC AIVS SNHNVMKDIL NFVGDSLHLP
301 SERGYNAMQV AALFGDK EAV KMLAKSAKPS DLNFKTSATP TPLNLACL RG DNEVVRGLVG
361 QHGIDINQRM GSDKNTVLHY AISKGDS FLV QKILAHTGVD VNCENNLGQT PLHLAVEGGD
421 PKIVSSLLKA GAVVNRLDDN GRSVLSAIV FGRKEKGV LG IVNKL LDRGA DINL DGDHNI
481 LFDQCLRGY NNVLDKLIQQ GVEVNRNSEI RPMVYAAISG NEHAIKSLAN AGGDVNEVNV
541 NPSSRHS GNP LIMVAVADGN AGLLKT LVSE GCDVGKSGKD GNTALHYAVS HSDKEFGNKA
601 IKILISRSNV GTNRDILTQK NNAGDTPLHE ALKSGNINSV QNILSAVHPR YAKEILTARD
661 KEGYTPMHYT VGVNNVDVGR SILEMLSKG VNNLGEIVGA QDSNFRTPLH AAIKISDYRA
721 ADMIIGSLSK TELSKLSQLT DINGDTPLHL SCQSGNVENT QFFLGGLDKR ELPKTLKIAN
781 KNGDTPLHDA IRNDDIKSAK MMIRNCNKEE LANVLKCKDS FGNTVLHTIA DQVIANPESK
841 KDLDGLMNL A VKRLKNQDLK DLVNTRNNSD DTVAHCALLS DMKYAQKILK SCNHDTLVRG
901 NSNNQSLSEC IRDDSKYKKG GIFSKSLFSK LKKLEAARAAS ASYEELSSIS SGSDVSSVST
961 NSTEVS AVPE VARSSGAVSF KHVQETGVDT SGPSDIESLE RLSDTSLGSN DFDQRMADLD
1021 QEIANIVSGL FEVTQVAVSQ QQAAPSSGQ AAGVQQKEMQ R.

SEQ ID NO:5 Secuencia de nucleótidos del fragmento de Clon 84 - ATPasa

ORIGEN

```

1 AATTATGCTG AAACACTCTT ATCATTGGT GAATCTCGAG CAGAAGGACG TGAATCTCCA
61 TCAAGTGCAT TTGTTCAAAC TGGTCAATCA GAAGTACCTC GGAGTGAGGC TGCAGAGCCA
121 TTAATTCAAT TTCTCATGA TGAAGAAAGT ACTGCATTAG GTTCTCAAGC AACTATGACA
181 GGAGTGTCTA CTCAGGCTAG TCCGTCAGCA GCATATCAGG ATGATAGTGA AATATCACGT
241 ATGAGGTCTA TGGCAGGAAC ATCTGCTCAA GCTGATCAAT CAGCAGTACA TCGTCGGAGT
301 GGTACAGCAT TAGAGCCATT AATTGAATTG 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 GTAGTAAGTG GTCATGAAAG ACCTGTTTCT TCTAGAGATT CAAGACAATT GGATGCATTT
601 GGTGATCCAT CAGATGATTT ATTGCCGAG AGTGAAATTA TTGTTAGCAG CAGTAAGAAA
661 GCAATATTAG ATAGCCAAA TGAAATAGAA TCTCTTATTC AGAGTGGAGA TACTTCTAGA
721 TGTATTAGGG CAATTAATAG TGCTCCTAGT GCGTCAGTGT TTCAACTGAA GACTTTATCG
781 AATGATATAT CTATTGCTGG ACGTGCTTTT TTAAATGGTA ATATTGATT AATAGAAGCT
841 TGTATGAATT CTGGCAAGAA ATTAATCCA AATATTACTG ATAATGAAA AAATACTCTA
901 TTACATCAAT TTGTAGGATA TTTTGAACGC GATCCGAGAA TGTTGCTTGA TGCAGGAATG
961 CGTAATCTGT TTTTGAGATT ATGCATGGAT TATGGTTTCG ATATTAATCA TAAAAATAGT
1021 AATGGTAATA CAGTACTTGA TAGATTAAAT GATTAGTAG AAGGGTTAAG TAGTTCGCAA
1081 GTTGATCTTG AAAGTAGTGG TATTGATGAG TTTATGATCT CATTGTTAGC TCATTCTAGA
1141 ATGAGTGATC AAGCAGTAAA GAATATTGCT ACTGCGCAAA ATGAGTTTTT TGCACGTGAT
1201 TCTGTTTATA ATATTAGTCG TTTAGTTGAT ACTTCTATAG TTTTGCAGAA TAAATTCAGT
1261 GAAGTATTTT ATGAAGCTCG TGGACGTATT TTATCTGAAG AAGCTGGTAA ACATAAGGGT
1321 GTTGCTGAAG CAAATTATTC AAGATTGAAT AAAATATTAA ATGATGAATG TCTTAGAAAG
1381 ACTTTAGCTA ATACAGATGC CGATGGAAAT AATGTTTTAC AGAGATTGTG TCAAGATATT
1441 GCTTCTGGAA AAATCAATGC TCGTGATGAC AGAGTATTAA AACTTTTTGA GACAATTATA
1501 TCTAATTAA AAGACAAAGA TAAAGCATT CTAGAGGATT TATTATTTAA TAATAGAAAC
1561 TCAAGATTTG AAAATTGCAT TGAAGCTATA CCACGTATTC CTGGTGCCGA TGCTCTATTT
1621 AAAAACTAG AAGAGTTATT ATTAATAAAG AAAATAGCAG AGTCTTGTA TTTTAATTCT
1681 ATGTTAGTGA ATTTGCTGA GTCTGCTAAT GATAATTTAT ATAATTACCT CGCCTAAT
1741 TATGCAGTTA TTGGTATAA TAACGTAGAT ATAAATGGCA ATTCATCCCT ATGTAAAGCT
1801 GTTGTTACTG GGTCAAGAG TATTGTTAAA GCAGTATTAT CAACTGGAAC TAATATTAAT
1861 AGGAAAGATA AAAATGGTAA TACACCTTTA CATGCATTGT TAATTTTTAT GATGCTAAC
1921 CCTGAACCTG TCAAGGAGCA ACATATTTC CTTGTGAAT TCTTAGCGTC TCGTGGAGCT
1981 TTAATTAAAT TAAAAATAA TATGAATATT TCTCCAATTA TGCTTGCAAG ATCTATTGAT
2041 AAGAAAGAGG AACTTGCTAA GAAATTACA AATCAAAAAG TTAGTATTTT AGAATCTTTA
2101 ATAGCTGGTA GTGAAGAACA TTTAGGGCTT AAATCCAAAT GTATATCTGA GTTAAAGCCT
2161 TATATAGAAAT TAGGAAAAGG CATGAAGTAC GAAGATATAC ATGCTGATGT AATAGGTGGT
2221 GTATTATCTG CTGATATGTG TAATGCTAGA TTGCAGATAG GTAAATTATT AAATGGTGAT
2281 TTTGTAAAG AAAATGAATT AAAGACAGTA AAATTTAATT TTCTGATAC AAATAAGGGT
2341 TATGTACAAA ATGTTGGTAA AAAAGAAAT TAT

```

SEQ ID NO:6 Secuencia de proteína del fragmento de Clon 84 - ATPasa

5

ORIGEN

```

1 NYAETTLSTF ESRAEGRESP SSAFVQTQGS EVPRSEAAEP LIQFFHDEES TALGSQATMT
61 GVSTQASPSA AYQDDSEISR MRSMAGTSAQ ADQSAVHRRS GTALEPLIEL PDEEENALD
121 FQTAMTGVPT QASPSAVHRS GVASDPTLPD DERIDVPSVS SQVVRPFS DG EDYSVYDKSG
181 VVSGHERPVS SRDSRQLDAF GDPSDDLLE SEIIVSSSKK AILDSQNEIE SLIQSGDTSR
241 CIRAINAPS ASVFQLKTL NDISIAGRAF LNGNIDLIEA CMNSGKKLNP NITDNEKNTL
301 LHQFVG YFER DPRMLLDAGM RNLFLRLCMD YGFDINHKN NGNTVLDRNL DLVEGLSSSQ
361 VDLESSGIDE FMISLLAHSR MSDQAVKNIA TAQNEFFARD SVYNISRLVD TSIVLQNKFS
421 EVFYEVCGRI LSEEAGKHKG VAEANYSRNL KILNDECLRK TLANTDADGN NVLQRLCQDI
481 ASGKINARDD RVLKLFETII SNLKDKDKAL LEDLLFNRRN SRFENCIEAI PRIPGADALF
541 KKLEELLKK KIAESCFNS MLVNCAESAN DNLYNYLRTN YAVIGINNV D INGNSSLCKA
601 VVTGSQGVIVK AVLSTGTNIN RKDKNGNTP L HALLIFMMSN PELVKEQHS LVKFLASRGA
661 LLNVKNNMNI SPIMLAESID KKEELAKKET NQKVSILES I IAGSEELHGL KSKCISELKP
721 YIELGKGMKY EDIHADVIGG VLSADMCNAR LQIGKLLNGD FCKENELKTV KFNFSIDNKG
781 YQVNVGKKRN Y

```

SEQ ID NO:7 - Secuencia de nucleótidos del fragmento de Clon 7 - ATPasa

ORIGEN

```

1 GTAAAAAAT TAAGATTATT ATTAATTCA ATAAGTGAGT TACCGCAAGA ATTAAGAT
61 CAAATTTTAA GTACTAGAAG TACTATAGAT AAATTACGAA ATAGAATTAA TGCTGCATA
121 AAGTCTGACG ATAGAGAAGG TATTGCACAT GCTGTAGAAT CTATGGCTAG TTCTTATTGT

```

```

181 GAATTATTAG GACATTGTAG ATTAATTTTT AAGAAATTAT ATGATGAAAA TGCTGATAAA
241 AGTTTGCTAG AATTATGTAT TAAAGAATAT CAATCTGATT TAAACAAATT ATTGGAACAA
301 GGTATTGATA TATGTGCTTC AGAAGTCTCA TCAGAAATGA AGGATTAGT TTGTAAGTA
361 TGTGAAGATG AATTTGAGAA ATATGACTCT TTATCTAAAG TACAAAGATT CAGGGAATTA
421 TCTGGTGAAA TTGCTGATTT GGATGATAAA TTAACAAGAA GGGCTTCTTT TGTGAGACT
481 TTTGGATTAT TTAGCAGTAG ATTAAGACAT TATAGGGAAA TTTTAGGAGA TGGTGATTTA
541 AAATTTTCGAG AGAGGATAGT TGAAAAATAT CAAGAGGATT TAAAGGAATT ATTAGAATTA
601 TCTGTTGATC TTCATTTGTT AATAAATTTA CCAGCATTAG AAGATTACG CGATCATAGA
661 AATTTAGTGC ATAGAGCATG TAATGCTGAA ATTGAAAAAT ATCTAACTTT ATTTGATGAT
721 CAACAATTAC GTACATTATC GCAAGAAGTG AATAATGCTC ATGGTGAAAT GATACAGATG
781 TTTTCTAAGT TTAGTATATT TGTGATGGC GTTACTGGTA TTGAACAGAG CACATCTCAA
841 GTAGAGCACC CTCGTTCTGA TATTGCTAAA AGAGATACTA CAACACCAAA GCAACGTGTT
901 GTGCAAGGTA AAGATGATAT 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 TTGAAGTTC TGGTGTAGT
1201 CAAGATGGTA TTACAACACC AGGACAACGT GTTGTGCAAG GTAAAGATGA TATACAATCT
1261 AGTGATAGTG ATAGTGATAG TAAATACGGT GATGATGATA GTAAAAAAGC ATCAGTAGT
1321 GCACCTGCTG TTGACCAAGT TGTACCTGTA GCTGATGTTT AACCTGAACC TCAGCTAGGT
1381 GAAAAATTGG AAACATTAGA GTCTAGTATA ACTAAAGGAC CTGAGTTGCC TGGTGTAGT
1441 TCTAGTGCTA AGCAATCTAT ACCTTTTGCG ATAACACCAT CAAGTCTGTA GACAGTTGAT
1501 GAAAAACTTG AAAGTTCTGG TGTAGTCAA GATGGTATTA CAACACCAGG ACAACGTGTT
1561 GTGCAAGGTA AAGATGATAT ACAATCTAGT GATAGTGATA GTGATAGTAA ATACGGTGAT
1621 GATGATAGTA AAAAAGCATC AGCTAGTGCA CCTGCTGTTG ACCAAGTTGT ACCTTCTGAC
1681 ACTCGTGCAG ATGGAGTATC AGAACCATTG GCATCTCATG TGGATCAAGG ATCTGATGTA
1741 CTTGGTGATG CATCTGTTGA TGGTGTGAT TTAAGATTAG GACGGTTATC TACTGAGCAA
1801 AGTGGATTGT TGCCACGTC TGAACAAAAT GTAAGAGCAT TTATTTTAGA ACAGAGTTTG
1861 TTAGATCAAT TATATATGGA CTATATAGAT TTACACCTG ATCAGAAAAG TTGTGAAGCT
1921 TATAATTGAG CATTGCATGG ATATAATACA AGATTAGAGT TACAGAAGGA ATATAACAGG
1981 ATTTTGAAT CACATGAATC AGCATCTCCA AATGAAATTA ATAGTTTTTC AAAAAATAT
2041 AGAGCAGCAT TAAGAGATGT TGCGCAGGAT ATTGTTAATC 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 de proteína del fragmento de Clon 7 - ATPasa

ORIGEN

```

1 VKKRLRLLLNS ISELPQELKD QILSTRSTID KLRNRINACI KSDDREGIAH AVESMASSYC
61 ELLGHCRLLIF KKLYDENADK SLLELCIKEY QSDLNKLEQ GIDICASEVS SECKDLVCKV
121 CEDEFKDYDS LSKVQRFREL SGEIADLDDK LTRRASVET FGLFSSRLRH YREILGDGDL
181 KFRERIVEKY QEDLKELLEL SVDLHLLINL PALEDLRDHR NLVHRACNAE IEKYLTFLFDD
241 QQLRTLQEV NNAHGLIOM FSKFSIFVDG VTGIEQSTSQ VEHPRSDIAK RDTTTPQQRV
301 VQGKDDIQSS DSDSDSDSKY GDDDSKKASV SAPAVDQVVP VADVQPEPQL GEGLETLESS
361 IAEQPELPGD ASTAKQSI PF AITPSSPETV DEKLESSGVV QDGITTPGQR VVQKDDIQS
421 SDDSDSKYK DDDSKKASAS APAVDQVVPV ADVQPEPQLG EKLETLESSI TKGFELPGDA
481 STAKQSIPFA ITPSSPETVD EKLESSGVVQ DGITTPGQRV VQGKDDIQSS DSDSDSKYGD
541 DDSKKASASA PAVDQVVPV TRADGVSEPL ASHVDQGSVD PGDASVDGVD LRLGRLSTEQ
601 SGLLRPRHEQN VRAFILEQSL LDQLYMDYID LHPDQKSCEA YNSALHGYNT RLELQKEYNR
661 IFESHESASP NEINSFSQKY RAALRDVAQD IVNQGPMPFYS SRDAMLLRAR VDTLCDMCRS
721 IRNLYMVELD AIDKEEKLQ SDMKSASSD KKLQEKELK L

```

5 SEQ ID NO:9: Secuencia de nucleótidos del antígeno de p16

ORIGEN

```

1 ATGTTACACG TTCAAAATCA TGTGATCAA CATACAAATC ATATAGAACA TGATGATTAC
61 CATTTTACTG GTCCTACTAG TTTTGAAGTT AATCTTTCTG AAGAAGAAAA AATGGAGTTA
121 CAAGAAGTAT CTTCTATTGA TAGTGATAGGA TGCGAAGATT GTGATCCAAA TTGTCGTTAT
181 CCTTTAGAAT TAGTAGAATG TCAGCGTATT GAGGAAAGAC CAGTATGCAA TGCAGGTTTA
241 GAGAGCTTGA CTGTTGATGC ATATCAATTA GGATTGTTGT TAGGTGGTTT TTTAAGTGCT
301 ATGAATTACA TATCTTATAG CTATCCTTGT TATTATTATG ATTGTTGTGA TAGAAATTAT
361 TACGACTGTT GTCATAAGAA TGCCTGTTAT TACAACCTGT GTGATTGTGC GTAA

```

SEQ ID NO:10 Secuencia de proteína del antígeno de p16

ORIGEN

```

1 MLHVQNHVQ HTNHIEHDDY HFTGPTSFEV NLSEEEKMEL QEVSSIDSVG CEDCDPNCRY
61 PLELVQCRI EEPVNCNAGL ESLTVDAYQL GLLGGFLSA MNYISYSYPC YYYDCCDRNY
121 YDCCHKNACY YNCCDCA.

```

SEQ ID NO:11 Secuencia de nucleótidos de proteína ribosomal L1

ORIGEN

```

1 ATGACGATTT TCTTAGAAAG TGATGATGAT AAGAGTAACT TTAAGAAGAC ATTGGAGAAC
61 GGTACTAAAG ACAAGACAAA TCTAGATAAT ACTTATTATG ACTATCATCA TGAAGATGAT
121 ATGGGAAATA CTGAATATCA TTATGTGAGT TTGGATAGAG TGGATCATGT TAAGATGCCT
181 GAAGAGCCTG TAGGTTATGG TGGAGATACT TTACCTATTG TTCCTACTAC AGCTGCTAGT
241 GTATCTGGTA GTGATGCAGG CGTTGCTGTA GGTAAATGTTA AAGATTTTGA AGATAATGTT
301 TTTTCATCATA CATCTACTAT AAGAAACGAT GAATTGAAGA TAGATTACG AATACATACT
361 TTAAGGATT TATCTGATAA AAGATTACGT GAAATTGAAA AGGGATTTAA TGATACGGTA
421 ACAAATTTA AAAATAATTT TGGGTTAGAA CCAAATGATG GAGAACTAT TTTTGATTTA
481 TACCTTTTGG ATGATAAGGA ACAAATATAAT TATTATGGAA AGCTTTATAA CTTAGGAATT
541 AGTGGATCTG GAGGTATGAC TTTCTATGGA AATGCTAATG TTCCATATAA AATTATGTA
601 CATCAATATG GTGAAATATT GAATTTAAAA CATGAATTAA CTCATGCATT AGAAAGTTAT
661 GCATCTGGAC ATAAATTTGCA TGGTTCTGAC GTAAATAGCA GAATATTTAC GGAAGGATTA
721 GCTGATTATA TCCAAGAAGA TAATAGTTTT ATTATGAGAG GATTAAAGGA TCGAGAGATC
781 ACTTCAGATG TATTGAAAGA TTCTTCTGGT AATGTAGATC ATTTAAGTGG TGTTCAGTG
841 AATGAAATC AGAGGTTAAG TTATAGTATA GGACATGCAT TTGTAAGCTT TTTACAAGAG
901 AAATATCCTA AGTTAATTTT GGAATATTTA AACGCATTAA AAGAGGATAA TATTATTCTG
961 GCTAAAGAAA TAATTAGTAT GGATAAGTAT CCAGATTTTG AGCCGTGGGT GAAGTCTAAA
1021 GACATTAGTT TATATTTAGA AAATATGAAAT GTATTAAAGT TAGGATTAGG TGAGAAAATG
1081 TTTTCTGCTG AAAGTGCTAG CTATTTTGAA GATCAAGGTG TCAATAAAGA ATATTACCAT
1141 GAAAATATTT ATGATATGAG TGGTAAACTA GTAGGTGAAA TGTCACTGT AGTGCATTAT
1201 GCACAAAAAA ATGTGATTGCG TATTTGGAAT ATTGCAAGTC CTGATATGAT AGAGTGGCGA
1261 CCAGAAATATA ACTTCTGAAA ATTGGTAACT ACTCCATCTG GTAAGTCTCG ATATGTATAT
1321 TGTGATAAGA ATGGGCATGA GTATTTTAAAT ACTAAAGATT ACATAGATTG TCGGTTTAAAT
1381 ATATTGGCAA GATATGATGT TAAGCTTCGT GAAAGTAGTG ATGCTTTGGA TATTAGAGGT
1441 CGTTACTCAG ATGCTGCTAA AGTGTTTAGT AAGCTGCCTA ATGCGGATTT GCTGTTGGAT
1501 AAGTTTTTAG AAAAAATAGG TTATAGTAGT TATAAGCAGA TAATAATGAG TAATCCAGAA
1561 CAGCTTAATT CTATTAAGGC TTATGTAGTA AAAGAAGTGT TTGAAAATTT TAGGGAATCT
1621 GAGGTCAAAA AGGTGTTGAG TGGTGAGTCT CATCCGGAAG TAAGAAATGT ATTAATGGAT
1681 CTTACCTATG TTGATTTAAA GAGTGTTATA GGAGTAAATG GTGCAGATAT TGACAGTAT
1741 ATTTCTAATC CAGATGTAAT GTTGCCTACT GCTGTGTTAG GTAAAGGAAA TGCAAGTGGG
1801 ATATCTCTAT ATGTAGATGA TCAGAAAGTT GGTGAGCTGT CAACTGAAGC AGGTATTGTT
1861 GTTAAAAATC TTGATACTGG TAAAGTGTAT TTTATGTTCC ATAATGTTGT TGGAATGATA
1921 GCAAGTGGTT ATGAAGACAG AGCATATATG GTTGATTAG AAAAAGATGG TAAGTTTACT
1981 ACTGCTCTAG TTAATAATAT AAAAAAGCA GCAGATGGAA ATGTTGTATG GGATAATCAA
2041 TTTAATCATC CGAATATTAA TAACTTGCAC TCAAATTATA AGGAGCTGTT GTTAAATGAT
2101 GCTTCAGTTA AAGATTACTC TCATCTTGCG GATGTGAAAT TTAATAAAGA TGATACAGTA
2161 ATTGTTTAAAG GTGAATTATT AGATGATAAA GGTACTGTAA GTGTAGATGA TGATGTACAT
2221 CGTGAGTTG TTAAGCATGA TGATCAAATA CTACATCAGT TTAAGAGTAT GTCTTTTTAC
2281 ATTACTGAAC CATCAGCTGA TTCAGGTGAC AATTATGGAA GTGATTTTTT CATTCTCGAT
2341 GAAGGAAAAA ATCTTAGATT TCAACTTCCT AAAGCTATTA CGCATTTGAA ATTGTTAAT
2401 GTTAATGGAA ATAATAAGTT GGTACCATGT ACTAAAGATG GGAATGAACA TCCTGAAGGT
2461 ATGCCATCTG ATTTAACGGA TGAATATAGA TATATAGATC CTATTTTTTG TCATACATTT
2521 GAGAAACAAA GTTATTCTAA AAATAGTATT AGTGTTGGGT TAGTGGACTT CAGTAAATAT
2581 AAAGAAGGAT CTATGTTTAA ATTACAGCAT TATTCTGATG ATTATCATAT TCATAGGAT
2641 GAACAAGGTA ATGTTATTAG GCCTAATAAC AGATCTTACG TTACAAAAGT GGATTTAGTA
2701 TATGATGATA AAGTTATTGG GATGTTGCTT GATAGTATAA ATCAATTTCA GGGTGATATT
2761 TTTATTTCTG CAAGCCTTAA TTATAGCCAC AATGATTTTC TTTTCATCTAA GTACTTTTCAG
2821 AAAGTTAATA TTGAGGCGTT AGAAAATGGA ATATATAGTG GAAGATATGA TGTAGGAGAT
2881 GGTGACCAAA TAGCAGGTCT TAATACTGAT ACAGGTATA GTGATAAAGC TATTTTTTAC
2941 TTTAAAAATG ATAGCGCATC TACTGATATG CCGGCTAGTG ATGTTACTAC TATTTTACCT
3001 TATATAAATG AGCTTTAA

```

SEQ ID NO:12 Secuencia de proteína de la proteína ribosomal L1

5

ORIGEN

```

1 MTIFLESDDD KSNFKKTLEN GTKDKTNLDN TYYDYHHEDD MGNTEYHYVS LDRVDHVKMP
61 EEPVGYGGDT LPIVPTTAAS VSGSDAGVAV GNVKDFEDNV FHHTSTIRND ELKIDLRIHT
121 LKDLSDKRLR EIEKGFNDTV TKFKNNFGLE PNDGETIFDL YLFDDKEQYN YYGKLYNLGI
181 SGSGGMTFYG NANVPYKIYV HQYGEILNLK HELTHALESY ASGHLHGSD VNSRIFTEGL
241 ADYIQEDNSF IMRGLKDREI TSDVLKDSGG NVDHLSGVAV NENQRLSYSI GHAFVSFLQE

301 KYPKLISEYL NALKEDNIIR AKEIISMDKY PDFEPWVKSK DISLYLENMN VLKGLGLEKM
361 FSAESASYFE DQGVNKEYYH ENIYDMSGKL VGEMSPVVHY AQKNVIRIWN IASPDMEIVR
421 PEYNFLKLVT TPGSKSAYVY CDKNGHEYFN TKDYIDSAFN ILARYDVKLR ESSDALDIRG
481 RYSDAAKVFS KLPNADLLLD KFLEKIGYSS YKQIIMSNE QLNSIKAYVV KEVFENFRES
541 EVKKVLSGES HPEVRNVLMC LTYVDLKSIV GVNAGADISI ISNPDVMLRT AVLKGKNASG
601 ISLYVDDQKV GELSTEAGYC VKNLDTGKVY FMFHNVVGMI ASGYEDRAYM VVLEKDGKFT
661 TALVNNIQKA ADGNVVVDNQ FNHPNINNLI SNYKELLND ASVKDYSHLA DVKFNKDDTV
721 IVKGELLDK GTVSVDDVDH RAVVKHDDQI LHQFKSMSFY ITEPSADSGD NYGSDFFISD
781 EGKNLRFQLP KAITHLKLVN VNGNKLVPK TKDGNHEPEG MPDLTDEYR YIDPIFAHTF
841 EKQSYSKNSI SVGLVDFSKY KEGSMFKLQH YSDDYHIHKD EQGNVIRPNN RSYVTKVDLV
901 YDDKIVGMLS DSIHQFQGDI FISASLNYSH NDFLSSKYFQ KVNIEALENG IYSGRYDVGD
961 GDQIAGLNTD TGYSDKAIFY FKNDASATDM PASDVTTILP YINEL.

```

SEQ ID NO:13 Secuencia de nucleótidos de proteína secretora de Tipo IV VirD4

ORIGEN

```

1 ATGGATAGTA TAAGTGCAAA TCACATACGC AATATTTTAT TCCTTGTTTT AGGCGCATT
61 TTTGGACTGG AATTTTGCTT TTATTTATCA GGTGTATTAT TCATCTTAAT GGTCTGGGGA
121 CCAAATTACC TAGATTTTAA TGCTATAAAT CCCAGTTTGA GTGATTTTCC AGACAGAATT
181 TGGCCAAC TAATTTGACTA TGTACAACAT TGGTGGGAAGA ACCCTTCTGC ATACGATGCA
241 GTTTTATTAC TTAAGCTAAT AACGTCATTA TGTACACCAG TAGGTATTCT AAGCATAGTA
301 TTATGGAAACC TTAGAAATAT ATTATTCGAT TGGAGGCCAT TTAAGAAGAA AGAATCACTG
361 CATGGAGATT CAAGATGGGC AACAGAAAAA GATATTCGCA AAATAGGATT ACGTAGTAGA
421 AAAGGAATAT TATTAGGGAA AGACAAGAGA GGATATCTCA TTGCAGATGG ATATCAACAT
481 GCATTGTTAT TTGCACCAAC TGGATCCGGA AAAGGTGTAG GTTTGTGAAT ACCAACTTA
541 TTATTCTGGG AAGATTCTGT AGTAGTACAC GATATAAAAT TAGAGAAC TAATCTTACA
601 AGTGGGTGGA GAAAAAAAG GGGACAAGAA GTTTTCGTGT GGAACCCAGC ACAACCTGAC
661 GGTATAAGTC ACTGTTACAA CCCATTAGAT TGGATAAGCT CTAAGCCTGG ACAAACTGTA
721 GATGATGTAC AAAAAATTGC CAATCTAATA ATGCCTGAAC AAGATTTTGT GTATAACGAA
781 GCACGTAGTT TATTTGTAGG AGTAGTATTA TACTTACTAG CAGTACCAGA AAAAGTAAAA
841 TCCTTTGGAG AAGTTGTAAG AACAAATGCGC AGCGATGACG TAGTCTACAA CTTAGCAGTA
901 GTACTAGACA CAATAGGGAA AAAGATTAC CAGTTGCAT ACATGAATAT AGCTGCATT
961 TTACAAAAG CAGACAAAGA ACGCTCAGGT GTTGTATCAA CTATGAAC TCCTTTAGAA
1021 TTATGGGCAA ACCCATTAAT AGATACAGCA ACAGCATCAA GTGATTTTAA TATTCAAGAA
1081 TTTAAAGGA AAAAAAGTAAC AGTATATGTT GGATTAACAC CAGATAATTT AACTCGTCTT
1141 AGACCTTTAA TGCAGGTATT TTATCAACAA GCTACAGAAT TTTTATGTAG AACTTTTACCA
1201 TCAGATGATG AACCATATGG TGTACTGTTC TTAATGGATG AGTTTCCAAC ATTAGGAAAA
1261 ATGGAGCAAT TTCAAACAGG TATCGCATAT TTCCGTGGAT ATAGAGTTAG ACTATTTTGT
1321 ATTATTCAAG ATACTGAACA GCTTAAGGAT ATATATGAAG AAGCAGGAAT GAACCTATTC
1381 TTATCAAAC CTACTTATAG AATAACTTTT GCTGCAATA ATATAGAAAC TGCAAAATTA
1441 ATATCACAGT TAATAGGAAA TAAACTGTT AACCAAGAGT CTTTAAACAG ACCTAAATTT
1501 TTAGATTTGA ACCCTGCATC ACGTTCATTA CATATATCAG AAACACAAAG AGCTTTTACTA
1561 TTACCTCAAG AAGTAATAAT GTTACCCAGA GATGAGCAAA TACTTTTAAAT AGAATCTACT
1621 TATCCTATAA AATCAAAGAA AATAAAATAC TATGAAGACA AAAATTTTAC AAAAAACTA
1681 TAAAGAGTA CCTTTGTTCC AACTCAAGAG CCTTATGATC CCAACAAAC AAAACAGCA
1741 ACAAAAGAAA ACGAAGAAC TATGCCAAGT ATTGAAAGCG ATCTTCCTAA AAATACATCT
1801 GACAATACTG AAAACAATAT GGAAGATGGT GCAATGTACA GCAGCATAGA AGAAGATTAT
1861 GACGATGATG ATGATGATTT TAATTTTGAA 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 ATGACAATA CTACAACAAA GATACCACTG ACGATCAAGA CTCAAAAAAA
2161 CATAATGAAT AG

```

SEQ ID NO:14 Secuencia de proteína de la proteína secretora de Tipo IV VirD4

5

ORIGEN

```

1 MDSISANHIR NILFLVLGAF FGLEFCFYLS GVLFILMVWG PNYLDFNAIN PLSLDFPDRI
61 WPTIFDYVQH WWKNPSAYDA VLLKLITSL CTPVGILSIV LWNLRNILEF WRPFKKKESL
121 HGDSTRWATEK DIRKIGLRSR KGILLGKDKR GYLIADGYQH ALLFAPTGS GVGVFVIPNL
181 LFWEDEVVVH DIKLENYDLT SGWRKKRGQE VFWNPAQPD GISHCYNPLD WISSKPGQMV
241 DDVQKIANLI MPEQDFWYNE ARSLFVGVL YLLAVPEKVK SFGEVVRTMR SDDVVYNLAV
301 VLDITIGKKIH PVAYMNIAP LQKADKERSG VVSTMNSSLE LWANPLIDTA TASSDFNIQE
361 FKRKKVTYV GLTPDNLTRL RPLMQVYQQ ATEFLCRTLP SDEPYGVLF LMDEFPTLGK
421 MEQFQTGIAY FRGYRVRLEF IIQDTEQLKG IYEEAGMNSF LSNSTYRITF AANNIETANL
481 ISQLIGNKTV NQESLNRPKF LDLNPASRSL HISETORALL LPQEVIMLPR DEQILLIEST
541 YPIKSKIKY YEDKNFTKKL LKSTFVPTQE PYDPNKTKTA TKENEPMPS IESDLPKNTS

```

```

601 DNTENNMEDEG AMYSSIEEDY DDDDDDFNFE DLDEYMDREE DYDDEEYDDI DYDDNNNSNE
661 EYEEDNPEED DNSNNLDDEE EEEDNIIDYE DEEEYDDNID YKDDNNYNK DTTDDQDSKK
721 HNE.

```

REIVINDICACIONES

1. Un método in vitro para determinar el estado de vacunación o infección de un animal por *Ehrlichia canis*, cuyo método comprende:

- 5 (a) poner en contacto una muestra biológica del animal con un reactivo que comprende uno o más primeros polipéptidos purificados de *E. canis* que comprenden las SEQ ID NOs: 2, 16, 17, o combinaciones de los mismos; y
- (b) detectar si uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* se unen específicamente a un anticuerpo en la muestra biológica;

10 en donde si el uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* se unen específicamente a un anticuerpo en la muestra, en ese caso el animal está infectado con *E. canis* y, si el uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* no se unen específicamente a un anticuerpo en la muestra, en ese caso el animal o no está infectado con *E. canis* o ha sido vacunado con una vacuna que no comprende el uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis*.

15 2. El método de la reivindicación 1, en donde la vacuna de *E. canis* comprende al menos un polipéptido de *E. canis* p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8, p28-9, proA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa, p43, p153, o una combinación de los mismos, o un vector que codifica al menos un polipéptido de *E. canis* p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8, p28-9, proA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa, p43, p153, o una combinación de los mismos.

20 3. El método de la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende además las etapas de detectar si un anticuerpo en la muestra se une específicamente a un segundo polipéptido purificado de *E. canis* que une específicamente un anticuerpo que es un componente de la respuesta inmunitaria del animal a la vacuna de *E. canis*, determinando así si el animal ha sido vacunado, en donde el segundo polipéptido purificado de *E. canis* es un polipéptido de *E. canis* p28-1, p28-2, p28-3, p28-4, p28-5, p28-6, p28-7, p28-8, p28-9, proA, ProB, mmpA, citocromo oxidasa, p43, p153, o una combinación de los mismos.

25 4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* están inmovilizados en un soporte sólido.

5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* están en una forma multimérica.

30 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el uno o más de los primeros polipéptidos purificados de *E. canis* están conectados a una proteína recombinante, un reactivo indicador, un espaciador de aminoácidos, un conector de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteínas, o una combinación de los mismos.

7. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, en donde el segundo polipéptido purificado de *E. canis* está inmovilizado en un soporte sólido.

35 8. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 7, en donde el segundo polipéptido purificado de *E. canis* está en forma multimérica.

9. El método de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, en donde el segundo polipéptido purificado de *E. canis* está unido a proteínas recombinantes, un reactivo indicador, un aminoácido espaciador, un conector de aminoácidos, una secuencia señal, una secuencia de transferencia de parada, un dominio transmembrana, un ligando de purificación de proteína, o una combinación de los mismos.

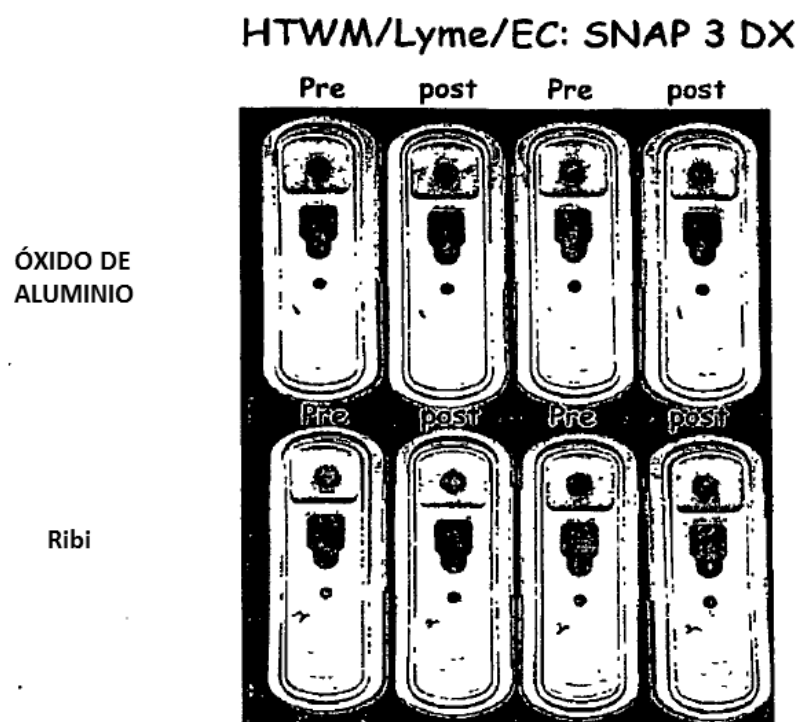


Figura 1

**Análisis GEL 2D de E. Canis – Teñido Aislado
con Azul de Coomassie Biosafe**

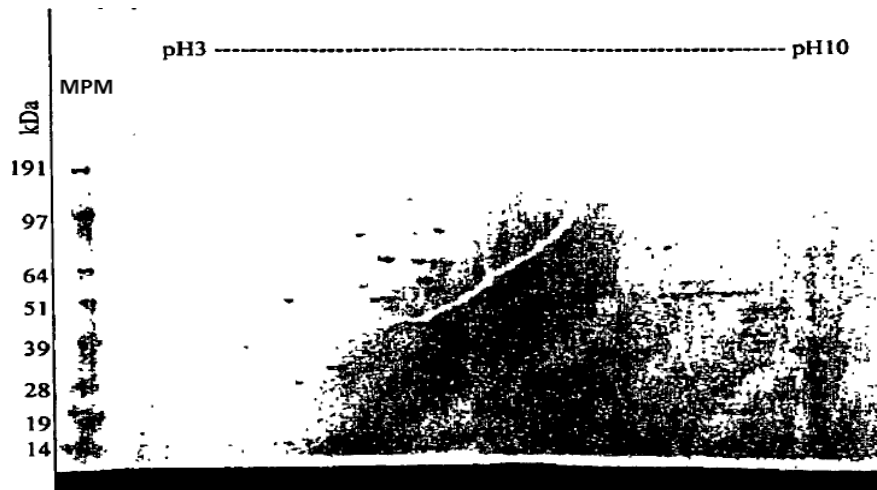


Figura 2

Transferencia Western de proteínas de E. Canis resueltas
utilizando geles 2D sondeados con plasma canino normal

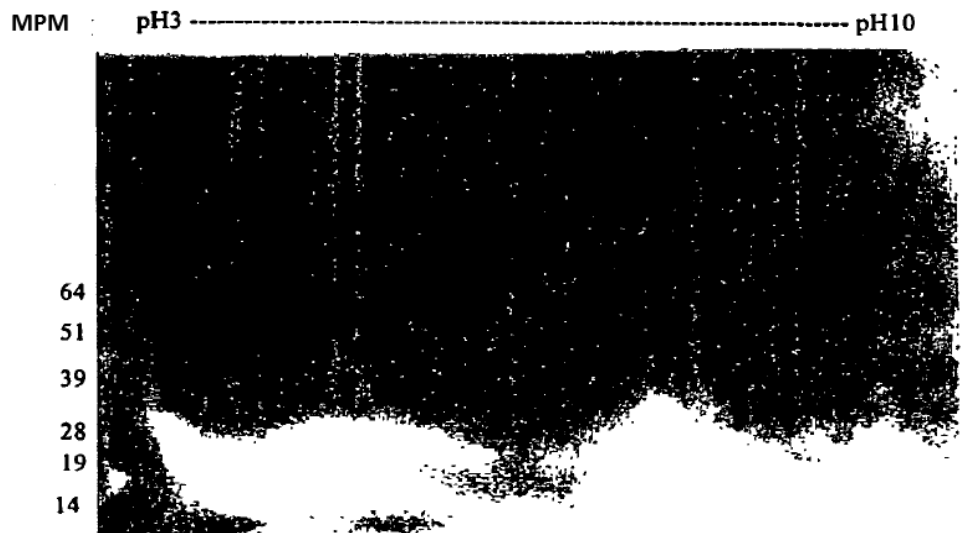


Figura 3

Análisis Western con Reserva de Sueros
Vacunados de 4 Perros Vacunados - 1:100

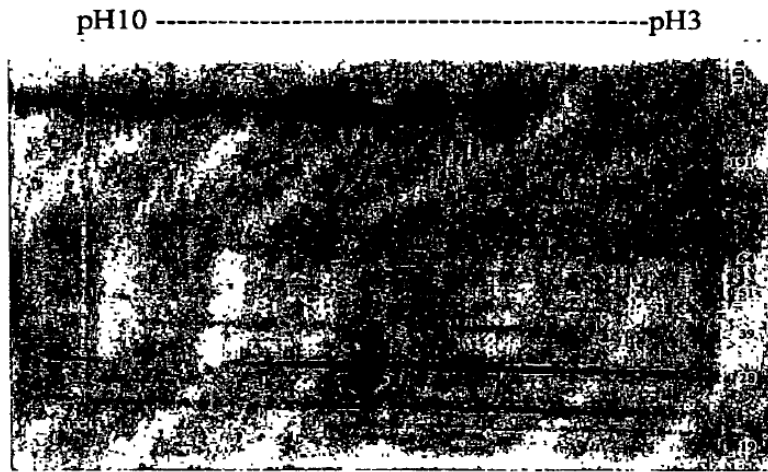


Figura 4

Análisis Western con Reserva de Sueros
Infectados de 3 Perros Positivos – 1:1.000

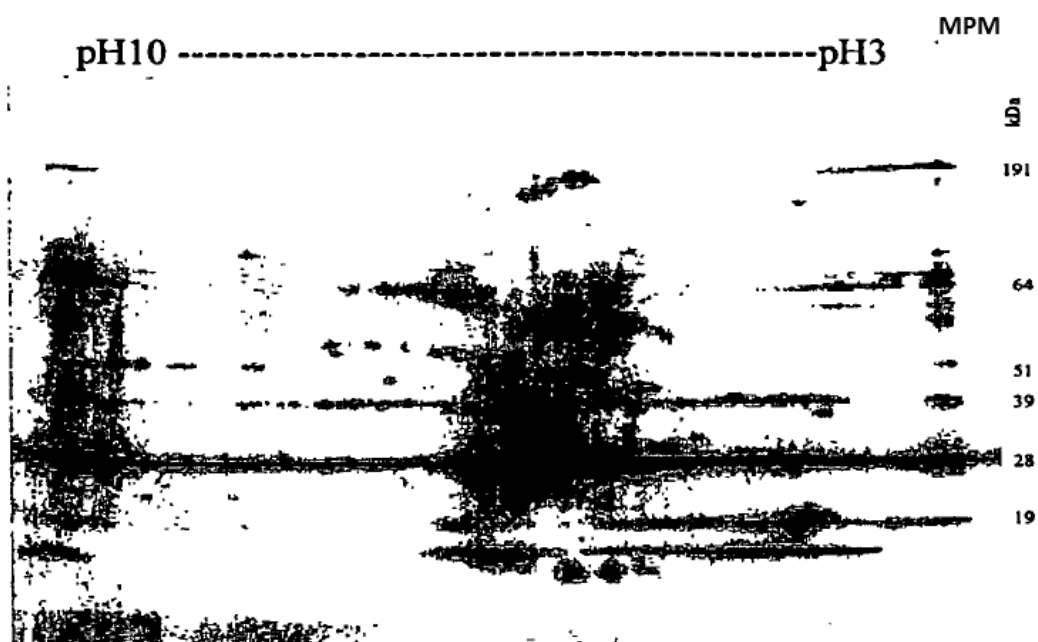


Figura 5

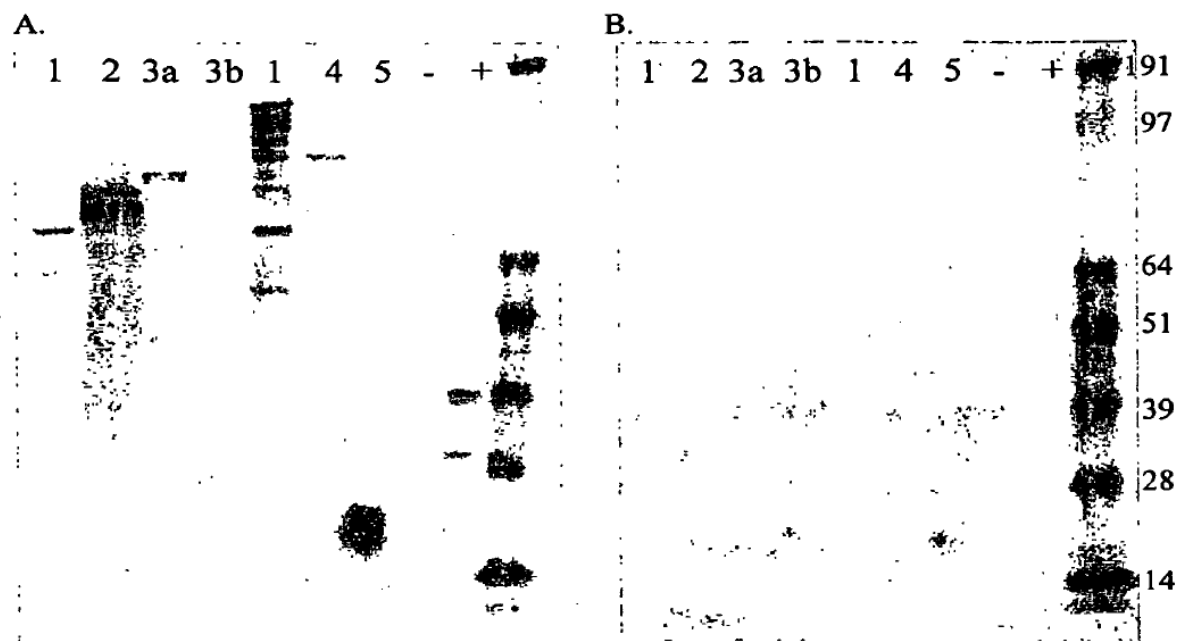


Figura 6.

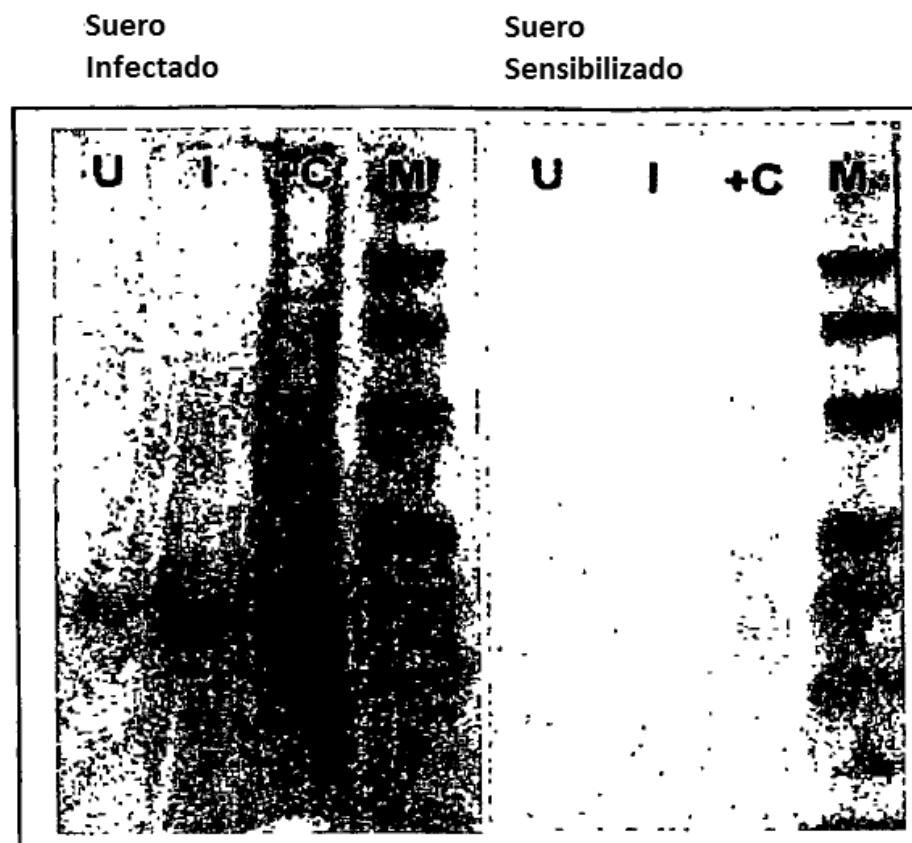


Figura 7

Figura 8

SEQ ID NO:15

MDIDNNNVTTSSSTQDKSGNLMEVIMRILNFGNNSD
 EKVSNEEDTKVLVESLQPAVNDNVGNPSSEVGKEEN
 APEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGKKVSETSKEE
 STPEVKAEDLQPAVDGSIHSSSEVGKVSKE
 ESTPEVKAEDLQPAVDDSVHSSSEVGKVSKE
 EENTPEVKAEDLQPAVDGSIHSSSEVGKVSKE
 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSVHSSSEVGKVSKE
 SKEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGKVSKE
 TSKEESTPEVKAEDLQPAVDDSVHSSSEVGKVSKE
 ETSKEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGKVSKE
 SETSKEESTPEVKAEDLQPAVDSSIHSSSEVGKKV
 VSETSKEESTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGK
 KVSETSKEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVG
 KEVSETSKEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEV
 GEKVSETSKEESTPEVKAEDLQPAVDDSVHSSSEV
 VGEKVSETSKEESTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSS
 EVGEKVSETSKEESTPEVKAEDLQPAVDGPNVPLNP
 MPSIDNIDTNIIFHYHKDCKKGSVGTDEMCCPVS
 ELMAGEHVHMYGIYVYRVQSVKDLGSGVFNIHSTC
 DCNLDVYFVGYNSTNKETVDLI

KEENAPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGKKVSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDGSIEHSSSEVGEKVSKTS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSV~~EH~~SSSEVGEKVSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDGSIEHSSSEVGEKVSKTS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSV~~EH~~SSSEVGEKVSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSKTS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSV~~EH~~SSSEVGEKVSETS
 KEENTPEVRAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDSI~~EH~~SSSEVGKKVSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
 KEENTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDDSV~~EH~~SSSEVGEKVSETS
 KEESTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
 KEESTPEVKA~~E~~ SEQ ID NO:16

Figura 9A

KEESTPEVKAEDLQPAVDGSVEHSSSEVGEKVSETS
 N R D I K K
 S

Consenso
 SEQ ID NO:17

Figura 9B